

Fremstilling av pektin-kitosan kombinasjonsfilmer ved nøytral pH egnet for inkorporering av liposomer

Masteroppgave i galenisk

Almina Colakovic



Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høst 2014

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo i perioden august 2013 til oktober 2014.

Jeg vil gjerne få takke min hovedveileder Sverre Arne Sande, for meget god veiledning og tett oppfølging både under det praktiske og skriftlige arbeidet med masteroppgaven.

Jeg vil også takke min medveileder Gro Smistad, for meget god veiledning, samt gode tips og råd om liposomer

En spesiell stor takk til avdelingsingeniør Tove Larsen, for god opplæring og utrettelig hjelp med alt på laboratoriet, samt alltid ha tid.

En stor takk til Bente Amalie Breiby for hjelp med frisettingsutstyret.

Jeg vil mest av alt takke min kommende mann Kumeet, for støtte og hjelp under hele studietiden og masteroppgaven.

Tusen takk til min foreldre og familie for oppmuntring og støtte under hele studietiden!

Til slutt vil jeg takke Dafina for fine stunder på laboratoriet og Josefine for hjelp med gjennomgangen.

Blindern, oktober 2014

Almina Colakovic

Sammendrag

Det har tidligere blitt konkludert med at kombinasjonsfilmer av pektin og kitosan har et stort potensial som mucoadhesiv formulering. For at dette skal kunne utnyttes mest mulig må frisetting av virkestoffet forlenges. Imidlertid har det vist seg at kombinasjon av forlenget virkestoff-frisetting og mucoadhesjon har vært utfordrende siden redusert frisettingshastighet ofte gav redusert mucoadhesjon, og vice versa. Denne problemstillingen ble forsøkt å løse ved å kombinere inkorporering av virkestoff i liposomer med kombinasjonsfilmer av pektin og kitosan.

Tidligere kombinasjonsfilmer har blitt fremstilt ved pH 1, noe som ansees uegnet for liposomer. Derfor ble en ny metode for fremstilling av kombinasjonsfilmer utviklet. Ettersom det dannes et polyelektrolytt kompleks, samt hydrogen bindinger ved nøytral pH, ble utviklingen komplisert. For å oppnå ønsket resultat ble ammoniumacetat, et flyktig salt, tatt i bruk for å skjerme ladninger, og urea for å bryte hydrogen bindinger. Liposomene ble fremstilt etter noe modifisert standard prosedyre, for å unngå osmotiske forskjeller mellom liposomenes indre og polymerløsningen. Liposomene ble lastet med en fluorescerende markør og inkorporert i nøytrale kombinasjonsfilmer. Frisetting av markøren fra dette systemet viste seg å være rask. Forventet forlengede frisettingen ble ikke oppnådd med nøytrale filmer. Det ble konkludert med at dette skyldtes at liposomene ble ødelagt under liposom-fremstillingen. Det ble i tillegg konkludert med at kombinasjonsfilmer ved nøytral pH ikke var løselig i lav og høy pH, samt i vann.

Innhold

Forord	1
Sammendrag	3
1. Innledning	7
1.1 Bakgrunn	7
1.2 Mål med oppgaven	7
2. Forkortelser	9
3. Teori	10
3.1 Liposomer	10
3.2 Polymere	16
3.3 Pektin	16
3.4 Kitosan	19
3.5 Molekylvekt	20
3.6 Pektin-kitosan kombinasjonsfilm	22
4. Utstyr, materialer og løsninger	25
4.1 Utstyr	25
4.2 Materialer	29
4.3 Løsninger	31
5. Metoder	37
5.1 Opprensing og karakterisering av HM-pektin	37
5.2 Fremstilling og karakterisering av liposomer	39
5.3 Fremstilling og karakterisering av HCl-filmer med liposomer	45
5.4 Metodeutvikling for fremstilling av filmer ved nøytral pH	49
5.5 Fremstilling og karakterisering av nøytrale CF-filmer med og uten liposomer	58
6. Resultater	61
6.1 Opprensing og molekylvekt bestemmelse av pektin	61
6.2 Størrelses- og zetapotensiale målinger av liposomer	64
6.3 Filmfremstilling og frisettingsforsøk for HCl-filmer	67
6.4 Metodeutvikling	70
6.5 Frisetting av CF fra filmer med liposomer og uten liposomer	83
7. Diskusjonen	87
7.1 HCl-og nøytrale filmdannelse	87
7.2 HCl- og nøytrale filmer- rehydrering	89

7.3 Nøytrale filmer – betydning av ulike faktorer.....	91
7.4 Frisetting og liposom stabilitet	94
7.5 Reløsning av filmer	99
7.6 Videre forskning	99
8. Konklusjon.....	100
9. Litteraturliste.....	102
10. Vedlegg	109

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

I en tidligere doktoravhandling har det blitt konkludert med at en blanding av to biopolymere pektin (25%) og kitosan (75%) har et stort potensial som mucoadhesiv formulering [1]. Dette blandingsforholdet svellet mest og gav imidlertid en rask frisetting av paracetamol, uladet modellsubstans, innkapslet i kombinasjonsfilmene fremstilt i 0,1 M HCl [2]. Fremstilling av kombinasjonsfilmer ved høyere pH har i tidligere forskning resultert i fase-separasjon [3]. Videre forskning innen dette feltet var en master oppgave der ladede modellsubstanser ble innkapslet i kombinasjonsfilmene. Det ble i denne sammenhengen konkludert med at ladede modellsubstanser forsinket frisettingen i viss grad [4]. Blandingsforholdene og deler av fremstillingsmetoden i denne oppgaven har sitt opphav i disse funnene.

Liposomer ble oppdaget på 1960-tallet og har siden vært av stor interesse for mange deriblant farmasøyer. Liposomer benyttes som legemiddelbærere og det forskes mye på nye formuleringsmuligheter [5]. På bakgrunn av dette har liposomene blitt brukt som modellsubstansbærere i denne oppgaven. Det har i tidligere studier vist at liposomer ikke tåler sure betingelser som tidligere kombinasjonsfilmer har blitt fremstilt ved [6].

Det endelige virkestedet for en slik formulering kan være flere, men fokuset i denne oppgaven er tynntarmen, og av den grunn ble det valgt et frisettingsmediet med pH 7 [7].

1.2 Mål med oppgaven

Det er begrenset nytte av mucoadhesjon dersom substansfrisettingen ikke forlenges. Det har i tidligere arbeid vært vanskelig å lykkes med å oppnå begge delene. Derfor var tanken å oppnå forlenget frisetting ved å kombinere inkorporering av substans i en nanopartikulær formulering og et biopolymernetttverk.

Hovedmålet med oppgaven var å innkapsle en modellsubstans i liposomer, som deretter inkorporeres i en castet pektin-kitosan kombinasjonsfilm. For således å oppnå forlenget frisetting.

Slutt målet med denne oppgaven er å utvikle et nytt formuleringsprinsipp, der pektin-kitosan kombinasjonfilmen innholdende liposomer med legemiddelsubstans innkapsles i en entro-kapsel. I tarmen oppløses entro-kapselen og kombinasjonsfilmen mucoadheres til tarmveggen mucin. Frisettingen vil være både spesifikk og forlenget siden legemiddelsubstansen må igjennom to systemer, både liposomer og film.

2. Forkortelser

HM	Høy metoksyliert
CF	5-(6)-karboxyfluorescein
μM	Mikromol pr liter
DD	Deacetyleringsgrad
LipoCFhydr	Liposomer med CF laget i hydreringmiddel
Lipohydr	Liposomer laget i hydreringsmiddel
LipoCF-PBS	Liposomer med CF laget i PBS
LipoPBS	Liposomer laget i PBS
PBS	Fosfatbuffer
PEC	Polyelektrolytt kompleks
RH	Relativ luftfuktighet
Rpm	Rotasjon pr. minutt
Cp	Enhet for dynamisk viskositet
Soya PC	Soya fosfatidylkolin
PI	Polydispersitetsindeks
GI-traktus	Gastrointestinal traktus
H-bindinger	Hydrogen-bindinger
DM	Metoksyleringsgraden

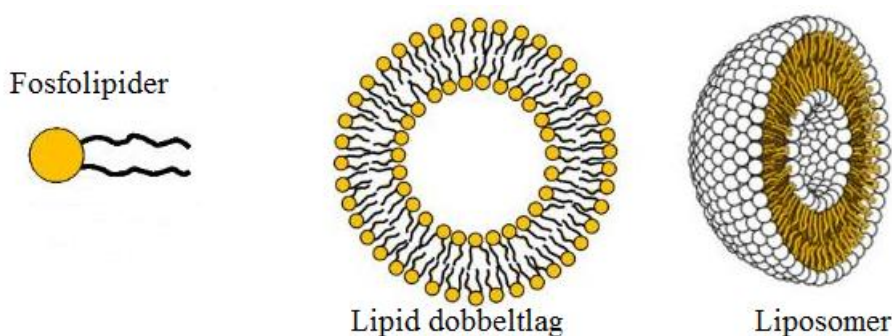
3. Teori

3.1 Liposomer

På 1960- tallet ble liposomene oppdaget av Bangham og kollegaene hans ved at det ble dannet vesikler når tørt lipidlag ble hydrert. Liposomene, fosfolipid vesikkelen, hadde evne til å innkapsle vandig løsning i kjernen eller alternativt hydrofobe molekyler inni lipidlaget. De viste seg i tillegg å være biodegraderbare og biokompatible. Liposomene ble ansett som ideelle legemiddelbærere [8], men det skulle ta 20 år før man for første gang tok i bruk liposomer som legemiddelbærere [9] for små legemidler, proteiner, enzymer, nukleotider og plasmid [8, 10]. På markedet i Norge i dag finne blant annet legemidlene amfotericin B (Ambisome®) og doksorubicin (Caelyx® og Mycocet®) som er basert på liposomale formuleringer, og blir henholdsvis brukt mot soppinfeksjon og kreft [11].

3.1.1 Generelt

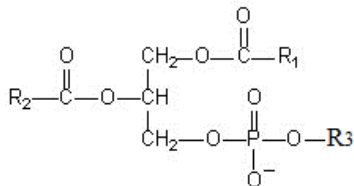
Liposomer, eller lipidvesikler, har en selv-lukkende struktur, og er bygget opp av et eller flere lipid dobbeltlag med en vandig indre kjerne. Dobbeltlaget består som oftest av fosfolipider, amfifile lipider, med en hydrofil hodegruppe og to hydrofobe halegrupper (Figur 1).



Figur 1: Oppbygning av liposomene samt lipid dobbeltlaget og fosfolipidene [12].

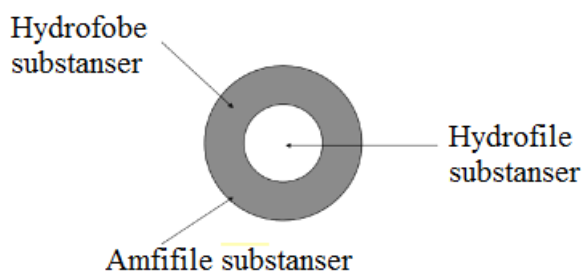
Halegruppene er to fettsyrer som er estrifisert til glyserol, og kan ha varierende lengde og metthetsgrad. Hodegruppene kan være positivt og/eller negativt ladet eller nøytrale [13]. Tabellen under viser noen eksempler på strukturer til hodegruppene, samt halegruppene.

Tabell 1: Generelle fosfolipid strukturformler [13].

Generell struktur av fosfolipider	Hodegrupper	Navn	Ladning
 <p>R₁ og R₂ er halegrupper som enten er mettet eller umettet</p> <p><u>Mettede:</u> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ n = 14 palmitinsyre n = 16 stearinsyre</p> <p><u>Umettede:</u> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$; C_{18:1} Oljesyre</p>	<p>R₃: - $\text{CH}_2\text{CHN}^+(\text{CH}_3)_3$</p> <p>R₃: - $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$</p>	<p>Fosfatidylkolin (PC)</p> <p>Fosfatidylglyserol (PG)</p>	<p>Zwitterion</p> <p>Negativ</p>

Disse amfifile stoffene orientere seg spontant til den mest termodynamisk stabile konformasjonen som vil si at de hydrofile gruppene orientere seg mot det vandige miljøet, mens de hydrofoben gruppene peker mot hverandre, vekk fra vandig miljø [10]. Det som skiller amfifile stoffer, brukt i liposom-sammenheng, fra andre er at de ordner seg geometrisk slik at det dannes et dobbeltlag. For å redusere eksponering i ytterkantene selv-lukkes dobbeltlaget rundt et vandig indre [10]. Formelen $P = v/(a \cdot l)$ der P står for pakke parameter, v er volum av molekylet, a er hodegruppe arealet og l er lengden av hydrokarbon kjeden(e), tar for seg aggregat formen/orienteringen av amfifile stoffer. Dersom halegruppene inneholder flere enn 8 hydrokarboner kan ikke micelle dannelse finne sted som også kan dannes av amfifile stoffer. Grunnen til dette er at kjedene er for «bulky» til å akkumuleres inn i en relativt liten micelle kjerne. Ved $P = 1$ dannes liposomer [14]. Størrelsen på liposomene vil kunne variere fra 20 nm til 20 µm i diameter avhengig av fremstillingsmetoden, og membrantykkelsen er normalt rundt 4 nm [13]. Liposomer kan enten være unilamellære eller multilamellære der førstnevnte er et enkelt dobbeltlipidlag, mens multilamellær er flere lags [10]. Hydrofobe substanser kan innkapsles i lipid dobbeltlaget, hydrofile i den vandige

kjernen eller i laget mellom de hydrofobe lipidlagene, og amfile substanser vil legge seg i grenseflaten mellom det hydrofile og hydrofobe (som illustrert i figur 2) [15, 16].



Figur 2: Inkorporering av substanser i liposomer [16].

En viktig parameter for dannelse av liposomer er rigiditeten til lipid dobbeltlaget. Hydrert fosfolipid dobbeltlag kan være både i flytende krystallform og i gelfase. Ved økt temperatur vil gelfasen smelte ved faseomvandlingstemperaturen (T_c) og omdannes fra gelfase til flytende krystallform. T_c er avhengig av kjedelengde, grad av metthet og polare hodegrupper, og kan variere fra $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ for egg PC (høy grad av umettede kjeder og varierende kjedelengder) til $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for DSPC (fullstendig mettet). For soya PC er T_c $23,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, slik at liposomene lages ved romtemperatur [13]. Gelfasen er mer rigid og mindre permeabel enn flytende krystallform. En interessant observasjon er at permeabiliteten er svært høy rundt T_c , noe som kan utnyttes til å friset innkapslet substans fra liposomene [17].

3.1.2 Stabilitet

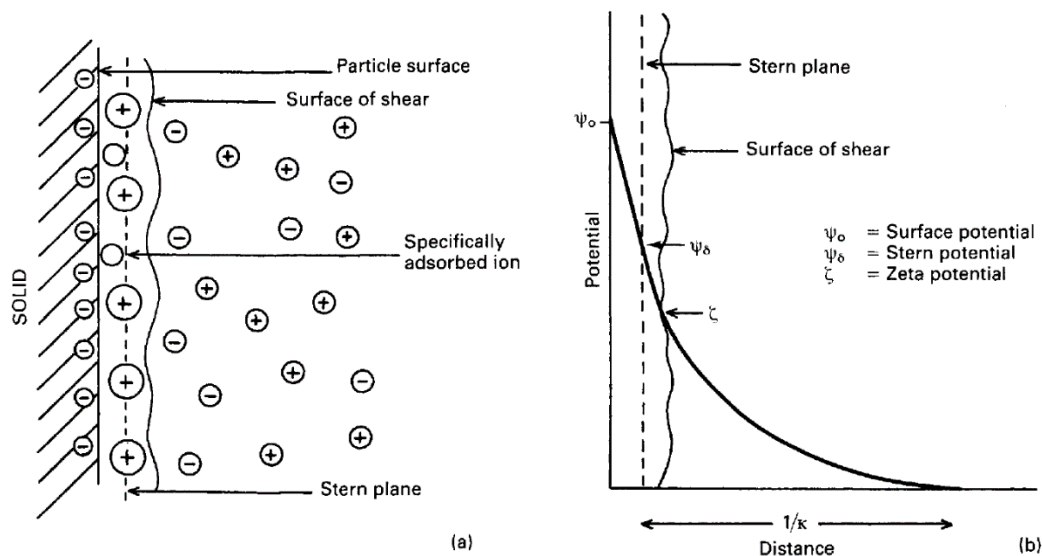
Kjemisk nedbrytning av fosfolipidene kan forekomme relativt lett siden de er bærere av umettede fettsyrer som er utsatt for oksidasjon, og esterbindinger som hydrolyseres. Det enkleste tiltaket for å unngå oksidasjon er å bytte ut umettede lipider med mettede, men dette kan påvirke liposomenes fasetilstand [9]. Dersom dette ikke er en mulighet kan oksidasjon reduseres ved tilsetning av antioxidant og radikal scavenger [9, 13] eller at liposomene kan oppbevares mørkt, kaldt og oksygenfritt. Oksygenfritt miljø kan oppnås ved at produksjonen foregår under tilsetning av nitrogen. Hydrolyse katalyseres i nærvær av syre og base. Minimum hydrolysehastighet oppnås ved å ha en pH ca 6,5 og ha lav bufferkonsentrasjon. I tillegg, om mulig, vil kalde oppbevaringsbetingelser og frysetørking også kunne redusere hydrolysen [9]. Frysetørking (lyofilisering) kan forbedre liposom stabiliteten ved a) fjerne vann og dermed forhindre hydrolyse av fosfolipider og b) redusere andre kjemiske og fysiske degraderingsprosesser ved at molekylene bevegelse reduseres i fast form [18].

Liposomenes shelf-life kan i tillegg påvirkes av fysiske prosesser som flokkulering/aggregering, fusjonering og for rask lekkasje av substans. Aggregering er dannelse av større enheter av individuelle liposomer. Denne prosessen kan reverseres med for eksempel tilføring av milde skjærkrefter, endre temperatur, inkludere ladning i lipidmembranen eller binde metall ioner som i utgangspunktet induerte aggregering. Fusjonering av dobbeltlaget er en ikke-reversibel prosess ettersom nye liposomstrukturer oppstår. I motsetning til aggregering, vil fusjonering forårsake substans lekkasje, spesielt dersom substansen er vannløselig [9, 18].

3.1.3 Karakterisering av liposomer

Zetapotensiale

I vandig miljø vil de fleste overflater få ladning. Følgende mekanismer kan danne ladning: frigivelses av ioner fra overflaten, ionisering av overflategrupper og ioneadsorpsjon fra løsningen. Overflateladningen påvirker distribusjonen av ioner i vandig miljø. Ioner av motsatt ladning enn overflaten blir tiltrukket, mens ioner med samme ladning frastøtes overflaten og får en annen fordeling i mediet. Resultatet av dette er et elektrisk dobbeltlag som deles i to: indre laget (Stern) med adsorberte ioner, og ytre diffuse laget der ioner er under påvirkning av elektriske krefter og termal bevegelse. Med økende avstand fra partikkeloverflaten vil antall ioner reduseres i det ytre laget. Disse to lagene er separert med et plan, såkalt Stern-planet som er en halv ionediameter fra overflaten. Motioner kan bli holdt ved overflaten via elektrostatiske tiltrekninger, og senteret av disse ionene danner Stern-laget. I tillegg til ionene i det indre laget, vil også en viss mengde løsemiddel i det ytre laget være bundet til ioner og den ladede overflaten. Ytterpunktet til laget med bundet løsemiddel, kalles skjærplanet, og ladningen her kalles zetapotensialet [19]. Liposomenes overflate kan være tilnærmet nøytral, positivt eller negativt ladet, avhengig av hvilke lipider som inngår i membranen og mediet liposomene analyseres i. Ionestyrken påvirker i stor grad zetapotensialet i og med økning i ioner vil føre til at $1/k$ (vist i figur 3) blir mindre og resulterer i redusert avstand mellom partiklene. Dette kan i noen tilfeller føre til aggregering og/eller koagulering[20, 21].



Figur 3: Zetapotensialet: a) Ionefordeling mot en ladet overflate, b) Endring i potensialet med økt avstand fra partikkeloverflaten [22].

Zetapotensialet kan blant annet måles ved hjelp av elektroforese. Denne metoden bygger på bevegelsen til ladede partikler (pluss festet ioner), suspendert i et vandig medium, under påvirkning av et kjent elektrisk felt. Positive partikler vil bevege seg mot motsatt ladet elektrode, og vise versa for negative partikler [19]. Viskøse krefter har en tendens til å forhindre denne bevegelsen inntil likevekt er nådd, og partiklene beveger seg med konstant hastighet. Hastigheten avhenger av styrken på det elektriske feltet, dielektrisitetskonstanten, viskositet i mediet og zetapotensialet, og blir referert til som elektroforetisk mobilitet [23]. Denne hastigheten bestemmes ved hjelp av doppler skift av lysspredning forårsaket av partikler som beveger seg i det elektriske feltet [18, 23]. Zetapotensialet kan relateres til den elektroforetiske mobiliteten ved hjelp av Henry likningen:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} * f(Ka)$$

Hvorav

U_E = elektroforetisk mobilitet

ε = dielektrisitetskonstanten

ζ = zetapotensialet

η = viskositet

$f(Ka)$ = Henrys funksjon [24].

Bruk av denne likningen forutsetter at dielektrisitetskonstanten, viskositeten og elektriske feltstyrken er konstant/kjent [23].

Størrelse

Foton korrelasjons spektroskopi (PCS) er en analysemetode som brukes for å måle partikkelstørrelse. Laserlys (helium-neon eller argon) blir sendt mot en prøve i en kyvette, og lysspredningen detekteres i en vinkel på 90 °. Denne vinkelen ble benyttet når prøvene ble analysert med Coulter N4 plus, mens med Zetasizer Nano ZS fant deteksjonen sted ved 173°C. Analysen bygger på tidsavhengige intensitetssvinging av lysspredning som følge av Brownske bevegelser av partikler i løsning/suspensjon. Siden små partikler beveger seg raskere enn store, vil svingningsfrekvensen av lysspredning variere tilsvarende. Mønsteret som oppstår som følge av svingningen brukes til å beregne diffusjonskoeffisienten til partikler i et bestemt medium. Dersom temperaturen og viskositeten er kjent kan man videre bruke diffusjonskoeffisienten til å beregne størrelsen på partiklene via Stoke-Einsteins likning: [18, 25]

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta R_h}$$

hvorav

D = diffusjonskoeffisienten

k = Boltzmann`s konstant

T = temperatur

η = viskositet

R_h = hydrodynamisk radius [18]

Polydispersitetsindeksen (PI) er et mål på størrelsesfordelingen. PI er dimensjonsløs og skalert fra 0 til 1 der 0 er perfekt monodispers som vil si at alle partiklene har samme form/størrelse og fordelingen er smal. Verdier under 0,05 er sjeldent sett, kun ved sterkt monodisperse standarder. Dersom $PI > 0,7$ er fordelingen svært dispers og bred/haledannende, og PCS egnet seg mest sannsynlig ikke som analysemetode [26].

3.2 Polymere

Polymere er substanser med høy molekylvekt, og er bygget opp av repeterende monomer enheter. Polymerens usedvanlige egenskaper kan forklares med en kombinasjon av flere faktorer, der i blant størrelsen, den tredimensjonale formen, monomerenes kjemiske egenskaper og sammensetning. I farmasøytisk sammenheng er bruk av polymerer utbredt, og de brukes blant annet i suspensjoner, emulsjoner, som pakkemateriale og som legemiddelbærere [27]. I tillegg forskes det på polymerenes egne potensielle medisinske effekter [28].

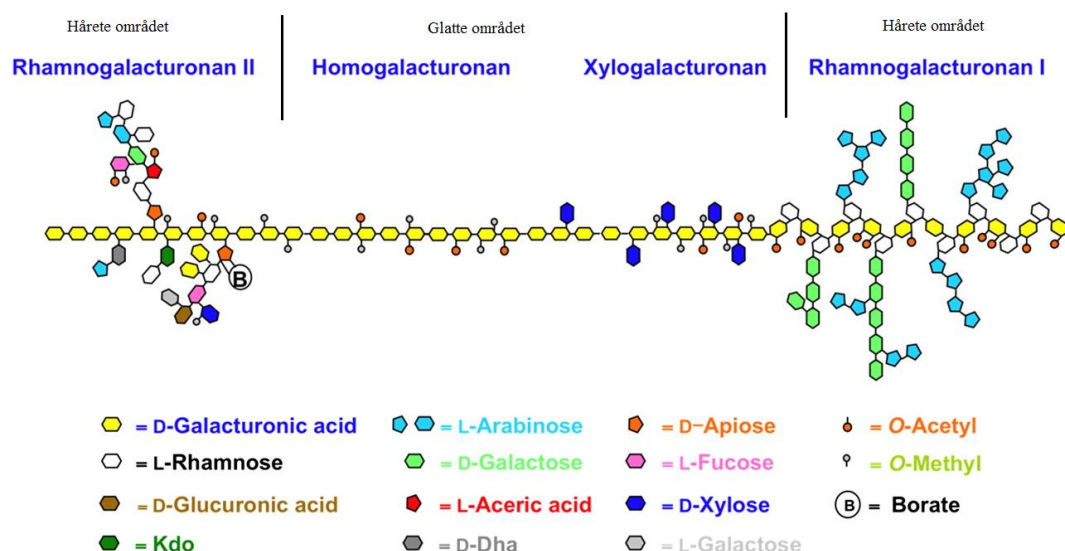
3.3 Pektin

3.3.1 Generelt

Pektin er en vannløselig polymer [27] og har sitt opphav fra celleveggen i høye planter. Pektin bidrar til mange av celleveggens funksjoner blant annet stivhet, rigiditet, ione-transport og vann retensjon, som igjen bestemmer porestørrelsen til celleveggen. Dette er en sentral del av plantens forsvarsmekanisme mot inntrengere, skader og stress [29]. Pektin er et rensset karbohydratprodukt fra ekstrahert sitrusfrukt skall og eplepurè [27].

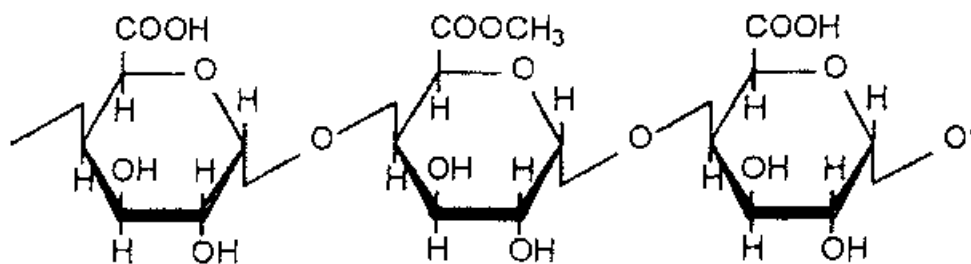
3.3.2 Struktur

Strukturen til pektin vist i figur 4 består av to hoveddeler, såkalte hårete- og glatte området.



Figur 4: Ulike monomere pektinstrukturen kan bestå av, samt det glatte- og hårete området [30].

Det glatte området består av D-galaktoronsyre enheter som er bundet med $\alpha(1 \rightarrow 4)$ bindinger (figur 5), der varierende antall syre-grupper er estrifisert med metanol. I hvor stor grad disse karboksylsyre-gruppene er forestret er angitt som molprosent metanol tilstede per 100 mol galaktoronsyre. Det er dette som kalles metoksyleringsgraden (DM-degree of demethoksylation), og pektin med en DM over 50% angis som høymetoksyliert pektin (HM-pektin). I motsatt tilfellet kalles det lavmetoksyliert pektin (LM-pektin) [29].



Figur 5: D-galaktoronsyre bundet med $\alpha(1 \rightarrow 4)$ bindinger [29].

Det hårete området, ryggraden, består av strukturen rhamnogalaturonan I der byggesteinene er rhamnose – og galaktoronsyre. Disse er ordnet slik at rhamnose er bundet med $\alpha(1 \rightarrow 2)$ binding og galaktonsyre enhetene er bundet med $\alpha(1 \rightarrow 4)$ binding annen hver. Figur 3 viser forgreninger med ulike enheter, derav navnet hårete [29].

I både den hårete og glatte delen vil hydrolyse av bindingene introdusere ustabilitet, og ved pH 3-4 er stabiliteten best [29].

Siden pektin er en polykarboksylsyre, vil den være negativt ladet ved nøytral pH, og uladet ved lav pH. Dette henger igjen sammen med at pKa verdien angis å være 3,5-4,5 [31].

3.3.3 Bruk av pektin

Bruk av pektin er utbredt innen mat- og farmasøytiskindustri [32]. I matindustrien anvendes pektin som fortykningsmiddel i syltetøy [33] og geldanner [32]. Pektin har i farmasøytisk forskning vist lovende medisinske effekter og blitt benyttet i ulike formuleringsprinsipper. De medisinske effektene er blant annet å senke kolesterolet, motvirke diare og regulere/beskytte gastrointestinal-(GI)-traktusen [32].

Innen formulering har pektin blitt brukt i forlenget frisetting av ambroxol fra *in-situ* geldannelse av pektin [34], pektin som hjelpestoff i pellets [35] nasal legemiddelformuleringer, [36] og oral legemiddelformuleringer med frisetting i colon [37]. Pektin vil passere intakt gjennom øvre GI og vil degraderes av enzymer i colon. Av den grunn er pektin godt egnet til spesifikk legemiddelfrisetting i colon [36]. Formuleringer som hydrogelkuler, matrikstabletter og filmer har blitt studert med formålet å frisettabletten legemidler i colon [37]. Disse formuleringene har enten blitt dannet med pektin alene, pektin med kalsium eller i kombinasjon med andre polymere som kitosan, cellulosederivater med flere. Det dannes ioneinteraksjoner mellom pektins negativt ladede karboksylsyre grupper og positivt ladet kalsium, samt interaksjon med andre polykationiske polymere har blitt anvendt i mange formuleringer [32].

Mucoadhesjon er en egenskap som pektin innehar som er avhengig av molekylvekt og DM, og blir også brukt i formuleringssammenheng. I litteraturen finner man ulike teorier om hvilke type bindinger som dannes mellom pektin og mucin, men forslaget om hydrogenbindinger og van der Waalske krefter mellom hydrofil pektin og mucin er formodentlig riktig [38, 39]. Mange ulike formuleringer har blitt studert tidligere deriblant mucoadhesive tabletter [40], mucoadhesive vaginale formuleringer [41], og pektin-coatede liposomer og deres interaksjon med mucin [42].

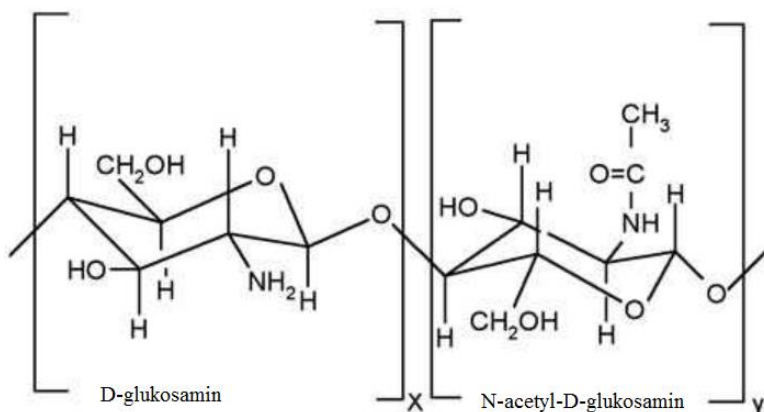
3.4 Kitosan

3.4.1 Generelt

Kitosan er en vannløselig polymer, som utvinnes ved å deacetylere kitin som er hovedbestanddelen av skallet til reker og krabber. Kitin finnes også i blant annet insekter og gjærsopp. I tillegg til at kitosan er en naturlig polymer, er den også nontoksisk og biodegraderbar [27, 43].

3.4.2 Struktur

Siden kitosan utvinnes via deacetyleringsreaksjon fra kitin er den en kationisk co-polymer av β -(1 \rightarrow 4)- bundet 2-amino-2-deoksy-D-glukopyranose (D-glukosamin) og 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopyranose (N-acetyl-D-glukosamin) vist i figur 6 [44].



Figur 6: Enhetene kitosan er bygget opp av [45].

Deacetyleringsgraden (DD-degree of deacetylation) brukes for å si noe om forholdet mellom disse enhetene. Dette forholdet, i tillegg til molekylvekten har signifikant effekt på egenskapene til kitosan, som for eksempel løselighet og rheologi [27, 44, 46]. Kitosan har en pK_a mellom 6,2-7,0, og løseligheten er pH-avhengig. Kitosan er lett løselig ved lav pH, og uløselig ved høy pH [47]. Stabiliteten påvirkes av glykosid-bindingen som er en hemiacetal og dermed syrelabil. Ved surt miljø vil hydrolyse forekomme som resulterer i nedsatt viskositet og molekylvekt [47].

3.4.3 Bruk av kitosan

Kitosan har chelaterende egenskaper og har vist evnen til å binde fett, kolesterol og metallioner, noe som kan utnyttes medisinsk. I tillegg har studier vist at kitosan kan hemme tumorceller, ha antimykotiske effekter og fremsynde sårtilhelingsprosessen [43, 48]. Innen farmasien utnyttes kitosanens mucoadhesive egenskaper i utstrakt grad i formuleringer [44]. Mange formuleringssystemer har blitt studert blant dem er nasal formulering [49], og colon formulering der kapsler ble coatet med kitosan og degradert i colon av mikroorganismer og enzymer [50]. Andre colon formuleringer er hydrogeler som flytende geler, kuler, filmer, kapsler, mikropartikler, mikrosfærer [51]. I alle formuleringene er kitosan enten assosiert med fysiske eller kjemiske kryss-bindinger [51]. I følge Genta I. et al vil det i tillegg dannes interaksjoner mellom positivt ladet kitosan og negativt ladet mucus [52]. Som med pektin har man også forsøkt å coate liposomer med kitosan, men i denne sammenhengen for å forlenge tiden liposomene er i øyet, noe som ikke har vist seg å være stor suksess [53]. En annen viktig observasjon er at kitosans molekylvekt, krystallisitet og grad av deacetylering kan varieres, og på den måten har man klart å kontrollere frisetting fra for eksempel kitosan-baserte granulat [53].

3.5 Molekylvekt

Molekylvekt bestemmer fysikalske egenskaper en polymer innehar. Det er flere faktorer som påvirker molekylvekten til en polymer. Her nevnes synteseveier, syntesemiljø, og ekstraksjonsforhold. For å bestemme molekylvekten til en polymer kreves det kjennskap til gjennomsnittsmolekylvekten og molekylvektfordelingen. De mest kjente angivelsene av gjennomsnittsmolekylvekt er a) antallsgjennomsnittet (M_n) som er mål på kjedelengde b) vektsgjennomsnittet (M_w) som er mål på størrelsen/vekten av polymer kjeden c) viskositetsgjennomsnitt der viskositeten er et mål på molekylvekten (M_v). Det finnes flere ulike metoder for å bestemme molekylvekt, men egenviskositeten (intrinsic viscosity) vil bli omtalt her [54].

Egenviskositeten målt i et spesifikt løsemiddel kan relateres til M_v med den empiriske Mark-Houwink likningen:

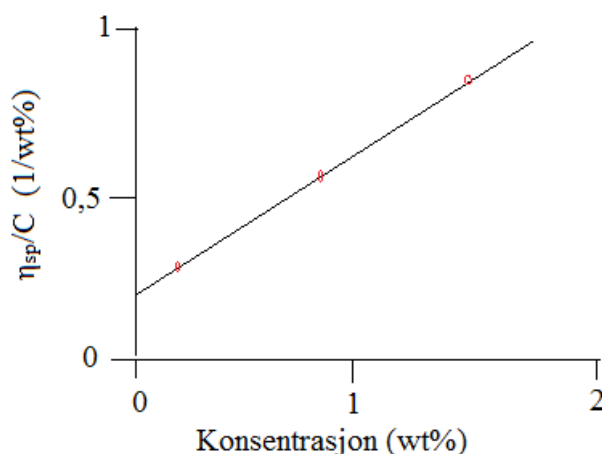
$$[\eta] = K \times Mv^\alpha$$

der $[\eta]$ er egenviskositeten, K og α er empiriske konstanter som vil variere fra type polymer, løsemiddel og temperatur [54]. Egenviskositeten er bestemt utfra den relative viskositeten til ulike polymerkonsentrasjoner.

Relativ viskositet: $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t \cdot p}{t_0 \cdot p_0}$ hvor 0 tilsier at det er løsemiddel, t er tiden

løsemidlet/polymerløsningen bruker i viskometeret på å passere to punkt med kun ved hjelp av tyngdekraften (utrenningstiden) og p er tettheten. For fortynnede prøver antas det at tettheten er lik i løsemidlet og polymerløsningen.

Spesifikk viskositet er bestemt ved $\eta_{sp} = \eta_r - 1 = \frac{t - t_0}{t_0}$ og redusert viskositet er η_{sp}/C der C tilsvarer konsentrasjonen. Egenviskositeten bestemmes vanligvis ved å plote konsentrasjonen mot redusert viskositet, nærmere bestemt $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{sp}/C)$. Den sistnevnte likningen vil si at når polymerkonsentrasjonen går mot null vil skjæringspunktet på y-aksen være den reduserte viskositeten= egenviskositeten, vist i figur 6. I tillegg kan man få informasjon om polymeren i løsning fra plottet (figur 7) ved å benytte formelen $\eta_{sp}/C = [\eta] + k' \cdot [\eta]^2 \cdot c$ til å finne Huggins konstant k' . Det vil være like mye frastøtningskrefter som tiltrekningskrefter når k' er lik 0,5, Θ - betingelser, men når k' under 0,5 blir det større tiltrekninger innad i polymeren enn frastøtning som skyldes at løsemidlet ikke er bra. I et godt løsemiddel strekker polymeren seg ut siden frastøtningskrefter er større og k' vil være over 0,5 [1].



Figur 7: Illustrasjon av et tenkt plott som fås ved at konsentrasjonen plottes mot η_{sp}/C . Skjæringspunktet med y-aksen er redusertviskositeten.

3.6 Pektin-kitosan kombinasjonsfilm

Pektin har evnen til å danne hydrofile filmer [55], noe kitosan også har [56]. Filmer basert på en kombinasjon av disse to polymerene har vist seg å være mer stabile, klarere og av bedre kvalitet [57]. I tillegg vil kombinasjonsfilmer være mindre løselige og mer pH-resistente. I pH området 3-6 vil begge disse polymerene være ladet og danne et polyelektrolytt kompleks (PEC), nærmere bestemt elektrostatiske interaksjoner [3]. Filmene kan få ulike egenskaper avhengig av blandingsforholdet mellom kitosan og pektin, samt mengde mykgjørere [2, 57].

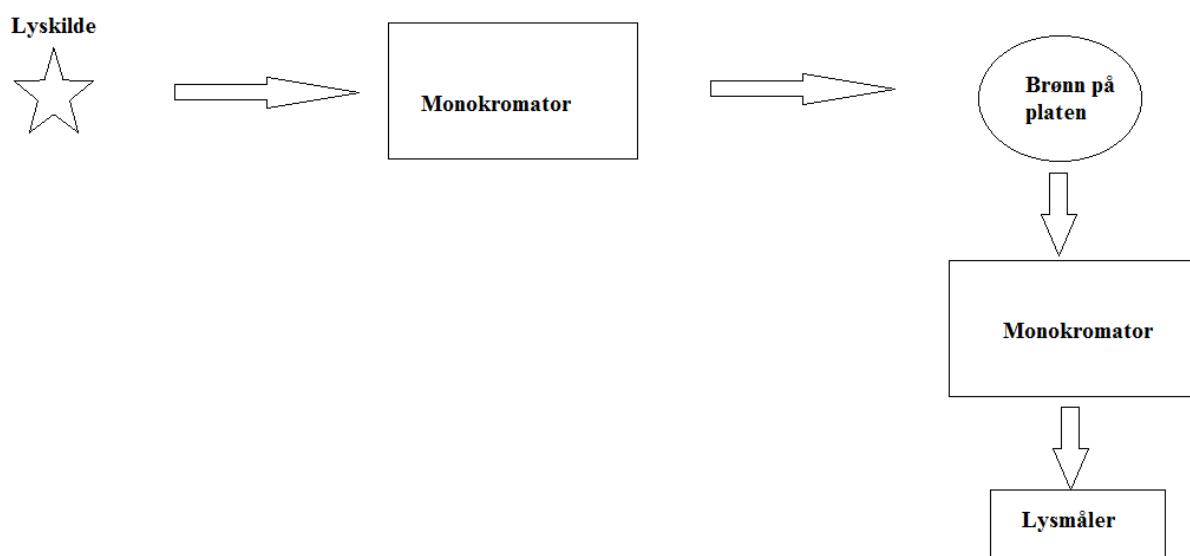
Ph.Eur (European Pharmacopoeia) har nylig utgitt en monografi på oromucosale doseringsformer. Selv om filmene i denne oppgaven er beregnet for mucoadhesjon i tynntarmen, er dette den nærmeste monografien til slike filmer. Orodispersible filmer er allerede en velkjent doseringsform i USA, og har de siste årene blitt meget populær formulering [58, 59]. Fordelen med en slik doseringsform er at det er enkelt å bruke, aksepteres lettere enn injeksjoner med mer [60]. Setofilm®, ondansetron, er en orodispersibel film som brukes primært som kvalmestillende, og har markedsføringstillatelse i Storbritannia. Polymeren i dette legemidlet er stivelse [61]. Oromucosale filmer fremstilles vanligvis av hydrofile polymere. De mest brukte er cellulosederivater som etylcellulose, hydroksycellulose, hydroksypropylcellulose, men alginat og kitosan benyttes også. Det er likhetstrekk mellom fremstillingsmetodene

for disse filmene og pektin-kitosan kombinasjonsfilmer ettersom polymerene løses i vann eller etanol, før løsemidlet fordamper og filmen tørker i begge tilfeller [59].

3.7 Fluorescensdeteksjon

Normalt vil molekyler være i laveste energitilstand, såkalt grunntilstand. Molekyler som absorberer elektromagnetisk stråling, tar opp kortvarig energien fra strålingen. Dette skaper et eksitert molekyl med høyere energitilstand. Som følge av dette dannes et ustabilt eksitert molekyl som ønsker å kvitte seg med overskuddet raskest mulig. Overskuddsenergien sendes vanligvis ut som varmen, men noe av energien omformes til elektromagnetisk stråling, emisjon. Med dette menes at prøven sender ut stråling, fluorescens. Fluorescens vil detekteres ved høyere bølglengde enn strålen som eksiterer molekylet fordi noe av energien avgis som

varme. Fluorescensstrålen vil av den grunn ha lavere energi og høyere bølgelengde. Figur 8 viser en skisse over fluorescensdeteksjon. Lampen er i denne sammenheng continuous waveform (CW). Det vil være monokromatorkontroll både på den eksiterte strålingen og det emitterte fra stoffet (fluorescensen). Den sistnevnte vil måles av lysmåleren. Ettersom fluorescensintensitet er proporsjonal med intensitet av strålingen som eksiterer stoffet, blir fluorescensintensiteten større ved sterkere stråling. I tillegg vil fluorescensintensiteten være avhengig av konsentrasjonen av fluorescerende stoffet. Derfor kan denne metoden benyttes i kvantitativ analyse [62].



Figur 8: Skisse over fluorescensdeteksjon [62].

UV-detektoren vil detektere stoffer som absorberer UV- stråling, derfor er det nærliggende å sammenlikne denne deteksjonen med fluorescensdeteksjon da metodene har fellestrekk i form av at begge absorberer stråling. I en 90 graders vinkel på den eksiterende strålingen detekteres fluorescenssignalet. Dette gir opphav til redusert bakgrunnsstøy og er grunnen til fluorescensdetektoren har lavere deteksjonsgrense sammenliknet med UV-detektor. Det er ikke alle stoffer som fluoresceres noe som begrenser metoden, men som samtidig gjør den mer selektiv i forhold til UV-deteksjon der ulike stoff kan ha samme bølgelengde. I tillegg kan svært lave konsentrasjoner detekteres og kvantifiseres, mens UV-detektoren egner seg mest til kvalitetskontroll [62].

I denne oppgaven vil CF være det fluorescerende stoffet, og vil eksiteres ved bølgelengde 485 nm og emitteres ved 535 nm. CF er lipofilt stoff, men i mindre grad sammenliknede med fluorescein. CF har blitt studert grundig i forhold til frisetting av den fra liposomer. Fluorescens intensiteten til CF (ikke quenched) er pH avhengig, og vil i pH området 6-8 øke

med en faktor på to siden ioniseringen av molekylet øker. Lekkasje av CF fra liposomer er økt ved lav pH. Dette er faktorer som vil føre til avvikende linearitet, samt quenching. Ved quenching fluorescerer ikke CF[63].

4. Utstyr, materialer og løsninger

4.1 Utstyr

4.1.1 Generelt utstyr

pH-meter	Modell MP220 Tilhørende elektrode InLab®Micro	MettlerToledo, Sveits MettlerToledo, Sveits
	Modell 744 Tilhørende elektrode Serienr: 0228.000	Metrohm Ltd, Sveits Metrohm Ltd, Sveits
Kalibreringsløsninger	Bufferløsning pH 2 Bufferløsning pH 4 Bufferløsning pH 7 Bufferløsning pH 9	Prolabo, Frankrike Prolabo, Frankrike Prolabo, Frankrike Prolabo, Frankrike
Finvekt	AG204 DeltaRang	MettlerToledo GmbH, Sveits
Grovvekt	PB3002 DeltaRange PE3600 DeltaRange	MettlerToledo GmbH, Sveits MettlerInstrumente AG, Sveits (brukt til saltsyre og fosforsyre)
Magnetrører	RCT basic RO5 R010	IKA®, Tyskland IKA®, Tyskland IKA®, Tyskland
Fuktmåler	HM 34 Humidity & temperatur meter serienr: 404908	Vaisala. Finland
Destillert vann		
MilliQ vann	Q-POD Millipore Med filtertype 0,22 µm Serienr: 0946, Batch: F2PA58716	Merck KGaA, Tyskland
Pipettespisser		
Pasteurpipetter, glass		
Vater		

4.1.2 Utstyr til pektin opprensing og molekylvektbestemmelse

Sentrifuge	Centra-MP4, serienr: 24373087	International Equipment Company, USA
Sentrifugerør Dialysemembran	Spectra/Po® 6 MWOC 8000	Spectrum Labratoris Inc, USA
Metanolbad	Hetofrig typer CB10 Serienr: 9002097	Heto Birkerød, Danmark
Frysetørker	Freeze dryer ALPHA-2-4, Serienr: 10249	Martin Christ GmbH, Tyskland
Vakumpumpe	Edwards RV8, serienr: 066390393	Edwards, England
Plastboks		
Kapillær til pektin	Kapillar-Viskosimeter type nr: 51613	Schott, Tyskland
Vannbad, viskositetsmåling	Bath Thermostat CTO50/2 Serienr: 141821	Schott- Gerate GmbH, Tyskland
Viskositetsmåler	Viscosity Measuring Unit AVS 310, serienr: 108631	Schott- Gerate GmbH, Tyskland

4.1.3 Utstyr til produksjon av liposomer

Rotavapor	Hei-VAP advantage ML/G3	Heidolph Instrumen GmbH, Tyskland
	Tilhørende membrane vakumpumpe type PC511	Vacuubrand GmbH, Tyskland
Frysetørker	Freeze dryer ALPHA-2-4, Serienr: 10249	Martin Christ GmbH, Tyskland
Rundkolber		
Ekstruder	Lipex Thermobarrell 10 ml	Northern Lipids, Canada
	Ekstruder tilleggsutstyr:	
	Membran: Whatman® Nuclepore, Track Etch Membran Polykarbonatmembran	

200nm diameter, k.nr:37186 Schleicher & Schuell,
England

Støttemembran: Whatman®
Drain disc, PE 25mm (dm)
Batch nr: 105355 Schleicher & Schuell,
England

Gelfiltreringskolonne PD-10 Desalting Columns
Batch nr: 393861,
Pakke nr: W393861 GE healthcare Bio-Sciences
AB, Sverige

4.1.4 Utstyr til måling av partikkelstørrelse og zetapotensiale

Partikkelstørrelse og zetapotensiale	Zetasizer Nano-ZS	Malvern Instruments, England
Partikkelstørrelse	Coulter N4 Pluss Submicron Particle Sizer	Coulter, USA
Engangskyvetter	Polystyrenkyvetter 10*10*45 mm	Sarstedt, Tyskland

4.1.5 Utstyr til filmproduksjon, analyse og reløsing av filmer

Varmeskap	Termaks Kbp 6087	Bergen, Norge
Magnetrrører med varme	MP3001K	Heidolph, Tyskland
Tørkeskap til granulat		
Temperaturmålere(3 typer)	1. IKATRON® ETS-D5 2. EKT 3001 3. Oregon Scientific, 433 MHz cable free	IKA®, Tyskland Heidolph, Tyskland
Eksikator		
Type petriskåler	Glass, plast	
Mikrometer	Cocraft®	
Teksturemåler	TA-XT2i Texture Analyser Med tilhørende utstyr til puncture test Analyse program	

	Texture expert	Stable Micro Systems, Surrey, England
Ultralyd bad	Transsonic 460/H	Elma, Tyskland
Stavmikser		
Sprøyte type	Polypropylen	
4.1.6 Utstyr til frisettingsforsøk		
Plateleser	Wallac Victor ³ 1420 Multilabel	Perkin-Elmer, USA
Whirlmixer	Reax Top	Heidolph, Tyskland
Sentrifuge	Centrifuge 5430R Serienr: 5428CK417750	Eppendorf AG, Tyskland
Sentrifugerør	Spin-X ^R UF 6 10kMWCO PES Non sterile 6 ml Batch: 30213014	
	Spin-X ^R UF 6 30kMWCO PES Non sterile 20 ml Batch: 24513008	Corning®, England
Gjennomstrømningscelle	Flow Through Flow-Cell Dissolution Tester Type DFZ 720	ERWEKA GmbH, Tyskland
	Med tilhørende utstyr: <u>Celleteype</u> : set (7) of USP 22,6 mm cell Type A <u>Varmeapparat</u> : Heater DH 2000i	ERWEKA, GmbH Tyskland
	Peristaltikk pumpe	ISMATEC® laboratoriums- Technik GmbH, Tyskland
Hvit Plate	Nunclon Delta Surface	Thermo Fischer Scientific Nunc A/S, Danmark

4.2 Materialer

4.2.1 Lipider

Lipid	Forkortelse	Batch-nummer	Produsent	Ladning
Soya Fosfatidylkolin (98%)	Soya-PC	792044-01/907	Lipoid GmbH, Tyskland	Svakt negativt/ nøytrale

4.2.2 Polymere

Polymer	Produkt navn	Grad av estrisering	Batch- nummer	Produsent
HM-pektin	Genu® pectin 150 USA-SAG	70,2% (metylestrifisert)	GR81611	CPKelco, Danmark
HM-pektin	Genu® pectin 150 USA-SAG		GR33619	CPKelco, Danmark
Kitosan	Chitosan, medium molecular weight (molekylvektområdet 190000-310000 Da)	80% (deacetylert)	07322TE	Sigma-Aldrich, Tyskland
Kitosan	Chitosan, medium molecular weight (molekylvektområdet 190000-310000 Da)	75% (deacetylert)	MKBJ9698V	Sigma-Aldrich, Tyskland

4.2.3 Andre kjemikalier

Stoff	Kvalitet	Batch-nummer	Produsent
Glycerol	Pro analysis	19H0703 (G- 5516 500ml)	Sigma-Aldrich, Tyskland
Glycerol	Reag.Ph.Eur	K44198692 305 (1.04092.1000)	Emsure® ACS, Tyskland
Hydrochlorid acid	37%, Pro analysis	K34727417 523	Merck. Tyskland

Potassium acetate	Extra pure Ph.Eur, BP, E 261	K34400520 510 (1.04820.1000)	Vaisala, Finland
Potassium acetate	Pro analysis	BCBG8506V	Fluka Analytical- Sigma Aldrich, England
Ortho-phosphoric acid	85%, Pro analysis	K38001273 742 (1.00573.1000)	Merck, Tyskland
Sodium dihydrogenphosphate- monohydrat	Pro analysis	A942646 706 (1.063.46.0500)	Merck, Tyskland
Trisodium phosphate (12 hydrate)		07 E090014	VWR International Prolabo, Leuven
Sodium dihydrogen phosphate-monohydrat	Pro analysis	K19893980 (6580.1000 330)	Merck, Tyskland
Sodium dihydrogen phosphat- monohydrat	Pro analysis	K25001880 (1.06580.1000)	Merck, Tyskland
Di-Sodium hydrogen phosphate, dihydrate	Pro analysis	K29977780 (1.06580.1000)	Merck, Tyskland
L-(+)-tartaric acid	Pro analysis	#STBD5101V	Sigma aldrich, Tyskland
Sodium tartrate dibasic dihydrate	Pro analysis	#1423905V	Sigma aldrich, Tyskland
Sodium Hexamethaphosphate		1.3282-250	Kebo Lab AB, Sverige
Ammonium acetate	Pro analysis	2378910 (art 1116)	Merck (Kebo), Tyskland
Sodium Hexamethaphosphate		P456399	BDH, AnalaR® England
Ammonium acetate	Pro analysis	A0522916 335 (1.01116.1000)	EMSURE® - Merck KGaA

Chloroform	Pro analysis	13C260521	Merck KGaA, Tyskland
Triton X-100 (t-oktylfenoksypropylpolyetoksyetanol)	Pro analysis	10K0192	Sigma, USA
Sodium hydroxide	Pro analysis	70800 42407C04	Fluka Chemika, Tyskland
Urea		10N0339/4	Apotekproduksjon AS, Norge
5(6)-carboxyfluorescein	Pro analysis	BCBJ4360V (21877-5G-F)	Sigma, USA
Kalium dihydrogenphosphate	Pro analysis	A31783 128 (1.04873.1000)	
Basisk såpe			
Sodium Chloride	Pro analysis	13F130010	AnalaR NPRMAPURE, Belgia

4.3 Løsninger

Om annet ikke står i teksten, ble det beskrevne løsningene under benyttet.

4.3.1 Løsninger til molekylvekt bestemmelse

Natrium heksametafosfat 1%

10 g natrium heksametafosfat ($((\text{NaPO}_3)_6)$) ble veid inn på et veieskip. En liters målekolbe ble så fylt med ca 0,8 L destillert vann. Natriumheksametafosfat ble tilsatt vannet og satt på omrøring på en magnetrører. Når alt var løst ble det tilsatt destillert slik at det totalt ble 1 liter løsning. pH-en ble justert til 4,5 +/- 0,1 med noen dråper 37% saltsyre.

4.3.2 Løsninger til film produksjon

1% (w/w) HM-pektinløsning

HM-pektinen ble tatt ut av kjøleskap en time før bruk. Ønsket mengde HM-pektin ble avveid på en finvekt i et plastveieskip ved hjelp av en pinsett. Deretter ble ønsket mengde og type løsemiddel avveid i et begerglass. HM-pektinen ble tilsatt løsemidlet sakte under omrøring på magnetrører. Løsningen ble dekket med aluminiumfolie (og parafilm) for å forhindre fordamping ettersom løsningen stod på røring over natten. Visuell kontroll på at alt var løst ble foretatt neste dag.

1% (w/w) kitosanløsning

Ønsket mengde kitosan ble avveid på et plastveieskip. Deretter ble ønsket mengde og type løsemiddel avveid i et begerglass. Kitosanen ble strødd sakte over løsemidlet under omrøring på magnetrører. Løsningen ble dekket med aluminiumfolie (og parafilm) for å forhindre fordamping ettersom løsningen stod på røring over natten. Visuell kontroll på at alt var løst ble foretatt neste dag.

0,1M HCl pH 1

I en målekolbe ble det tilsatt litt destillert vann før 9,87 g 37% saltsyre(HCl) ble addert ved hjelp av en glass-pipette. Deretter ble til tilsatt destillert vann ad 1 liter. pH-en ble justert ved hjelp av 1 M NaOH eller 2 M HCl

100 mM fosforsyreløsning pH 1,6

I en målekolbe skylt med destillert, ionebytte vann ble det tilsatt litt destillert vann før 0,49 g fosforsyre (H_3PO_4) avveid på en finvekt rett i en målekolbe ved hjelp av en glasspipette. Deretter ble destillert vann tilsatt ad 50 ml.

10 mM fosforsyreløsning pH 2,2

I en målekolbe skylt med destillert vann ble det tilsatt litt destillert vann før 0,12 g fosforsyre (H_3PO_4) avveid på en finvekt rett i en målekolbe ved hjelp av en glasspipette. Deretter ble destillert vann tilsatt ad 100 ml.

Tilnærmet 100 mM fosfatbuffer pH 2,1

7,8 g av natrium dihydrogenfosfat –monohydrate($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ble innveid på at veieskip. Til en målekolbe skylt med destillert, ionebytte vann ble 3,4 ml fosforsyre

(H_3PO_4) pipettert ut med en glasspipette. På forhånd var det blitt tilsatt noe destiller, ionebyttet vann, for å unngå varmeutvikling. Deretter ble natrium dihydrogenfosfat-monohydraten tilsatt også før destillert vann ble tilsatt til 1 liter. Det ble foretatt en visuell vurdering på om alt var løst [64].

Tilnærmet 50 mM fosfatbuffer pH 2,8

6,8 g av natrium dihydrogenfosfat –monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ble innveid på at veieskip. En målekolbe skylt med destillert, ionebytte vann ble fylt med litt destillert, ionebytte. 0,68 ml fosforsyre (H_3PO_4) ble pipettert ut med en glasspipette i en målesylinder som ble tilsatt vannet i målekolben. Deretter ble natrium dihydrogenfosfat-monohydraten tilsatt også før destillert vann ble tilsatt til 1 liter. Det ble foretatt en visuell vurdering på om at var løst [64].

Tilnærmet 127mM fosfatbuffer pH 3,4

Det ble først forsøkt å øke pH-en ved å innveie 7,02 g av natrium dihydrogenfosfat –monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) på at veieskip. En målekolbe skylt med destillert, ionebytte vann ble fylt med litt destillert, ionebytte. 0,34 ml fosforsyre (H_3PO_4) ble pipettert ut med en glasspipette i en målesylinder som ble tilsatt vannet i målekolben. Deretter ble natrium dihydrogenfosfat-monohydraten tilsatt også før destillert vann ble tilsatt til 1 liter. Ettersom pH-en kun ble 3,02, ble det innveid mer natrium dihydrogenfosfat –monohydrate på at veieskip slik at det totalt var 19 g og tilsatt målekolben. Dette gav en pH på 3,4, og det ble foretatt en visuell vurdering på om at var løst.

Fosfatbuffer pH 7 og 8

0,2 M dinatrium hydrogenfosfat: 35,61 g dinatrium hydrogenfosfat dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ble innveid på et plastveieskip og overført til en 1 liters målekolbe skylt med destillert vann. Tørrstoffet ble løst i destillert vann.

0,2 M natrium dihydrogenfosfat: 27,60 g natrium dihydrogenfosfat monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ble innveid på et plastveieskip og overført til en 1 liters målekolbe skylt med destillert vann. Tørrstoffet ble løst i destillert vann.

For å lage 0,1 M fosfatbuffer med pH 7 ble det tilsatt 30,5 ml med 0,2 M dinatrium hydrogenfosfat, og 19,5 ml 0,2 M natrium dihydrogenfosfat i en målekolbe skylt med destillert vann. Deretter ble det tilsatt destillert vann til 100 ml.

For å lage 0,1 M fosfatbuffer med pH 8 ble det tilsatt 47,35 ml med 0,2 M dinatrium hydrogenfosfat, og 2,65 ml 0,2 M natrium dihydrogenfosfat i en målekolbe skylt med destillert vann. Deretter ble det tilsatt destillert vann til 100 ml.

Disse fosfatbufferene ble oppbevart i kjøleskap (4°C) fordi de er mest stabile i kjøleskap og for å hindre vekst [65].

10 mM Vinsyre buffer pH 3 og 4

1,13 g vinsyre/tartrat syre ($C_4H_6O_6$ - tartaric acid) og 0,58 g dinatrium tartrat dihydrat ($Na_2C_4H_4O_6 \cdot 2H_2O$) ble innveid på en finvekt i hvert sitt plastveieskip. En skylt målekolbe ble det tilsatt litt destillert vann før saltene ble tilsatt. Deretter ble det tilsatt destillert vann til 1 liter. Dette gav pH ca 3. Det samme ble gjort for å lage en buffer med pH 4, med unntak av at det ble innveid 0,375 g vinsyre($C_4H_6O_6$) og 1,726 g dinatrium tartrat dihydrat ($Na_2C_4H_4O_6 \cdot 2H_2O$). Det ble visuelt observert at vinsyrebufferne var løst og løsningene ble oppbevart i kjøleskap (4°C)

5 M Ammoniumacetat løsning

192,75 g ammoniumacetat ble veid ut på et veieskip og tilsatt en skylt målekolbe som det på forhånd hadde blitt tilsatt litt destillert vann. Deretter ble det tilsatt destillert vann til 500 ml. Løsningen stod over natten og det ble foretatt visuell vurdering om alt var løst. Løsningen ble oppbevar i romtemperatur på lab-benken.

4.3.3 Løsninger til liposom produksjon

Stamløsninger av lipider

Det ble laget stamløsninger av soya-PC (soya phosphatidylcholine) som ble brukt i liposomproduksjonen. Lipidene som tørrstoff ble oppbevart i fryser, og ble romtemperert (20 °C) før åpning. Før bruk ble hetteglass og målekolber skylt med kloroform og avdampet i avtrekk.

Soya- PC 10mg/ml

200 mg soya-PC ble innveid på et glassveieskip på finvekten og overført til en 20 ml målekolbe. Veieskipet ble spylt med kloroform. Kloroform ble så tilsatt ad 20 ml. Stamlløsningen ble overført til rent hetteglass og fylt med N₂ før proppfalsing og oppbevart i fryser (-18 °C).

Soya- PC 25 mg/ml

500 mg soya-PC ble innveid på et glassveieskip på finvekten og overført til en 20 ml målekolbe. Veieskipet ble spylt med kloroform. Kloroform ble så tilsatt ad 20 ml. Stamlløsningen ble overført til rent hetteglass og fylt med N₂ før proppfalsing og oppbevart i fryser (-18 °C).

4.3.4 Løsninger til frisettingsforsøk

Triton X-100 2% (w/w)

1 g Triton X-100 ble innveid direkte i en støvfri glassflaske med brunt lokk på. Deretter ble det litt etter litt innveid 50 g fosfatbuffer 0,2mM pH 7. Triton-X 100 ble løst ved forsiktig manuell svingning for å unngå skumming. Denne løsningen ble oppbevart i romtemperatur (~20 °C).

Fosfatbuffer 0,2M pH 7 – PBS [7].

0,2 M kaliumdihydrogenfosfat: 6,8 g kaliumdihydrogenfosfat (KH₂PO₄) ble innveid på et plastveieskip og overført til en 250 ml målekolbe skylt med MilliQ-vann. Tørrstoffet ble løst i MilliQ-vann.

0,2 M natriumhydroksid: 8 g natriumhydroksid (NaOH) ble innveid på et plastveieskip og overført til en 250 ml målekolbe skylt med MilliQ-vann. Tørrstoffet ble løst i MilliQ-vann.

Deretter ble det overført 250 ml av 0,2 M kaliumdihydrogenfosfatløsning og 145,5 ml av 0,2M Natriumhydroksidløsning til skylt 1L målekolbe. MilliQ-vann ble addert til 1L. Dersom det ble benyttet destillert vann ble løsningen filtrert gjennom et polykarbonatmembranfiltrat (nuclepore 0,2 µm) ved hjelp av filteroppsats og overført til skylt glassflaske. Bufferen ble oppbevart i kjøleskap (4°C).

Ammoniumacetat og urea løsning - hydreringsmiddel

8 g urea og 16,7 g ammoniumacetat ble innveid på plastveieskip og ble overført til en skylt 250 ml målekolbe. Tørrstoffet ble løst i MilliQ-vann ad 250 ml. Dersom det ble benyttet destillert vann ble løsningen filtrert gjennom et polykarbonatmembranfiltrat (nuclepore 0,2 μm) ved hjelp av filteroppsats og overført til skylt glassflaske. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap (4°C).

CF 1,5mM

11,3 mg 5-(6) karboksylfluoresin ble innveid på et glassveieskip på en finvekt og overført til en 20 ml målekolbe. Hydreringsmidlet eller 0,2M fosfatbuffer pH 7 ble tilsatt ad 20 ml og tørrstoffet løst. Det ble visuelt observert om alt var løst. Stoffet og løsninger ble beskyttet mot lys under tillaging, oppbevaring, fortynning og bruk. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap (4°C).

5. Metoder

5.1 Opprensing og karakterisering av HM-pektin

5.1.1 Opprensing av HM-pektin

Hensikt:

HM-pektin varierer mye fra batch til batch ettersom den utvinnes fra naturlig plantematerialet, og i tillegg er den ikke rensset av produsenten [29, 39]. For å eliminere dette feilbidraget, fortas en renseprosess av HM-pektin før bruk.

Fremgangsmåte:

Masteroppgaven Oven-Storfjell beskriver effektivisering og standardisering av metoden [4] (SOP- se vedlegg 1) og det er denne metoden som ligger til grunne for HM-pektin opprensingen. 1000g 1,5% (w/v) HM-pektin ble løst i destillert vann, ved at vannet ble tilsatt først og deretter ble innveid HM-pektin drysset over. Klumper som ble dannet, ble knust med en glass-stav. Denne løsningen ble satt på omrøring på en magnetrører over natten. Til sentrifugerør av plast (ca 200 ml rør) ble HM-pektinløsningen overført, og rørene ble satt på sentrifugering på 4400 rpm i 60 minutter. Ved sentrifugerings slutt ble HM-pektinløsningen dekantert over i nye sentrifugerør, og satt på ytterligere 4400 rpm i 60 minutter. Det ble foretatt visuell observasjon av mengde urenheter som ble værende igjen i sentrifugeringsrørene. Dersom mye ble observert, var det nødvendig med enda en sentrifugeringsrunde. Det ble benyttet dialyseslanger til opprensing siden disse består av en semi-permeabel membran med en viss «cut-off»-verdi. Molekyler med lavere molekylvekt enn denne verdien ville diffundere ut av membranen [66].

Dialyseslanger ble klippet opp (34 cm, lengden til en 1000 ml målesylinder, til 200 ml løsning) og lagt i vann i en stålskål slik at konserveringsmidlet natriumazid ble fjernet. Etter siste sentrifugering ble supernatantene samlet i et skylt begerglass, og etterblandet på en magnetrører. Deretter ble supernatanten dekantering til hver sin dialyseslang før de ble satt ned i hver sin 1000 ml målesylinder. Målesylinderen ble fylt med vann og satt i kjøleskap, der de stod hele dialysetiden for å hindre vekst av bakterier og sopp. Vannet ble skiftet en gang daglig i syv påfølgende dager. For å sikre at slangene ikke sklei ut, ble en sil benyttet til å tette målesylinder åpningen. Hastigheten av diffusjonen er avhengig av konsentrasjonsgradienten, av den grunn ble vannet skiftet hyppig. Etter endt dialyse ble løsningene blandet sammen i et

skylt begerglass før ca 200 ml HM-pektinløsningen ble fylt på 1000 ml rundkolber. Under rotasjon, i 15 minutter på metanolbad ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), ble løsningen fryst ned, før kolbene ble hengt på frysetørkeren i 48 timer for å sublimere. Den rensede HM-pektinen ble overført til plastbokser og ble oppbevart i kjøleskap (4°C). For å unngå at HM-pektinen ble hygroskopisk og elektrostatisk måtte plastboksen tas ut av kjøleskapet minst 1 time før bruk [67].

5.1.2 Molekylvektbestemmelse

Hensikt

Det er en direkte korrelasjon mellom molekylvekten til polymere og fysiske egenskaper en polymer har [54]. Molekylvekten forventes å påvirke filmdannelsesegenskapene, og siden den ikke var deklartert fra produsenten ble det gjennomført en molekylvektbestemmelse.

Fremgangsmåte

Det ble laget 50g 0,5% (w/w) rensed HM-pektin i 1% natriumheksametafosfat (kapittel 4.3.1). 1% natriumheksametafosfat ble brukt for å hindrer aggregering under molekylvektmålingene [39].

Ved aggregering vil ikke polymeren strekke seg ut og dermed fås mindre molekylvekt enn det virkelig er. Derfor etterstrebes det å oppnå θ -bestingelser [68].

Utrenningstidmålinger ble utført dagen etter med Micro-Ostwald viskometer med tilhørende vannbad og kapillær. Vannbadet ble innstilt på $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ og for hver konsentrasjon foretok apparatet automatisk tre målinger. For hver måling ble 2 ml av aktuell løsning tilsatt det tykkeste røret i kapillæret. Deretter stod kapillæret i vannbadet for temperering før målingen ble utført. Mellom hver måling ble kapillæret vasket to ganger med destillert vann og to ganger med aceton. Til slutt tørket med nitrogengass.

Dette ble utført på en gammel batch av rensed HM-pektin og en ny batch. Først ble det foretatt måling av ren 1% natriumheksametafosfat og deretter ble HM-pektinløsningen fortynnet hhv. til konsentrasjonen 0,3%, 0,25%, 0,20%, 0,15%, 0,10% [69]. En forutsetning for å bruke denne metoden er at løsningene følger newtonsk flyt, noe fortynnede polymerløsningen gjør [54].

5.2 Fremstilling og karakterisering av liposomer

5.2.1 Fremstilling av Soya-PC liposomer

Hensikt

Lage liposomer som kan lastes opp med en fluorescens markør, CF, for så å brukes videre i frisettingsforsøk.

Fremgangsmåte

Utgangspunkt for soya-PC liposom produksjonen var en SOP (vedlegg 2). Soya-PC liposomer ble valgt fordi dette er i væskefase ved romtemperatur og man unngår oppvarming under produksjonen [13]. CF innlasting i liposomene er helt avhengig av god løselighet av CF i løsemidlet. CF fluorescerer kun når det er oppløst, og dersom det ikke er fullstendig løst kan resultatene bli feil [63]. Derfor ble dette verifisert. Bakgrunnen for valg av CF var en tidligere master oppgave der denne fluorescensmarkøren ikke utviste aggregering ved innkapsling [70].

Tabellen 2 viser en oversikt over de ulike liposomtypene som har blitt fremstilt. Senere i teksten blir fremgangsmåten detaljert beskrevet.

Tabell 2: Oppsummering av de ulike liposomtypene som ble laget, samt antall batcher og de ulike mengdene som ble tilsatt.

Type liposomer (forkortet)	Totalt antall fremstilte batcher	Mengde stamløsning	Mengde oppløsningsvæske
Lipohydr.	5	3,9 ml (10mg/ml, kapittel 4.3.3) i tillegg ad 5 ml kloroform	5 ml hydreringsmiddel (kapittel 4.3.4)
LipoCFhydr	4	2,1 ml (25mg/ml, kapittel 4.3.3) i tillegg ad 2,5 ml kloroform	2,5 ml hydreringsmiddel med 1,5 mM CF (kapittel 4.3.4)
LipoPBS	1	3,9 ml (10 mg/ml kapittel 4.3.3) i tillegg ad 5 ml kloroform	5 ml PBS (kapittel 4.3.4)
LipoCF-PBS	1	2,1 ml (10 mg/ml kapittel 4.3.3) i tillegg ad 5 ml kloroform	2,5 ml PBS med 1,5mM CF (kapittel 4.3.4)

Tillaging

Av lipid stamløsningen ble det tatt ut ønsket mengde, se tabell 2, og dette ble overført til en rundkolbe på 250 ml. Kloroform ble tilsatt avhengig av type liposomer, se tabell 2, for å sørge for en bedre fordeling av lipidene i kolben slik at laget blir tynnast mulig. I tillegg vil det oppnås passende areal i kolben som oppløsningsvæsken skal dekke ved tilsetning.

Kloroformen ble dampet av på rotavapor med en omdreiningshastighet på 90 rpm, under vakuum ved 40 °C. Inndampingen foregikk under gradvis trykksenkning ned til 200 mbar hvor lipidlaget ble stående til filmene var visuelt tørre. Deretter ble trykket senket ytterligere ned til 60-65 mbar, der kolbene ble hengende i 20 minutter. Rundkolbene ble så satt på frysetørker over natten for å fjerne løsemiddelrester.

Liposomdannelse

Det antall ml oppløsningsvæske gitt i tabell 2 ble tilsatt rundkolben med lipidlag under manuell svingning av kolben. N₂ ble tilsatt i kolben og suspensjonen ble hydrert på rotavapor med en omdreingshastighet på 90 rpm i 10 minutter. Suspensjonen ble satt til henfall i romtemperatur i 2 timer under manuell svingning innimellom, før den ble satt i kjøleskapet (4°C) over natten.

Ekstrusjon

Reduksjon av liposomstørrelsen ble utført ved ekstrudering. Det ble benyttet en støttemembran og to polykarbonatmembranfiltre) for å sikre ønsket størrelse. Først ble ekstruderen vasket med 2 x 10 ml hydreringsmiddel eller fosfatbuffer pH 7 for å fjerne urenheter og fukte membranene. Lipidsuspensjonen ble ekstrudert gjennom filteret 10 ganger med < 10 mbar for å oppnå riktig størrelsesfordeling. Det skal ikke mye trykk til for å få disse liposomene igjennom filteret. For å sikre at trykket ikke blir høyere enn 50 mbar går en sikringsventil ved overskridelse.

5.2.2 Gelfiltrering

Hensikt:

Gelfiltrering ble utført for å sikre at ikke-innkapslet CF fjernes, da dette kunne forstyrre kvantifiseringen.

Fremgangsmåten:**Metting av kolonnen:**

Kolonnen mettes med tomme liposomer for å sikre at liposomer som skulle brukes videre ikke forsvant i porene. Lipohydr ble benyttet dersom ikke-innkapslet CF skulle fjernes fra LipoCFhydr. Først ble kolonnen tømt for saltløsning. Deretter ble ekvibreringen utført ved at kolonnen ble vasket med 25 ml hydreringsmiddel. 2,1 ml hydreringsmiddel ble tilsatt et skylt, støvfritt hetteglass, før 0,9 ml Lipohydr tilsatt i hetteglasset. Dette ble blandet godt sammen, før 2,5 ml av denne blandingen ble påsatt kolonnen. Denne fortynningen ble utført for å unngå at kolonnen ble helt tatt. Den appliserte mengden ble eluert ut med 20 ml hydreringsmiddel. Det ble utført en visuell kontroll av at eluatet var mer turbid enn hydreringsmidlet eller PBS. Dette var en indikasjon på at kolonnen var mettet. Dersom kolonnen ikke skulle brukes straks etterpå, ble det påsatt 2,5 ml hydreringsmiddel for å unngå at kolonnen tørker. Ved fjerning av ikke-innkapslet karboxyfluorescein fra LipoCF-PBS ble kolonnen mettet med lipoPBS og resten ble utført som beskrevet over, med unntak av at det ble benyttet PBS i stedet for hydreringsmiddel.

Fjerning av ikke- innkapslet CF:

2,1 ml LipoCFhydr ble tilsatt et skylt, støvfritt hetteglass, deretter ble 0,4 ml hydreringsmiddel ble tilsatt samme hetteglass, og blandet godt. Deretter ble 2,5 ml av denne blandingen applisert på gelfiltreringskolonnen og eluert ut med 3,5 ml hydreringsmiddel. I et brunt skylt, støvfritt hetteglass ble eluatet samlet opp, og 1,75 ml hydreringsmiddel tilsatt. Dette gav en teoretisk lipidkonsentrasjon på 10 mM og en CF sluttkonsentrasjon på 0,6mM. Kolonnen ble vasket med hydreringsmiddel 25 ml *2, slik at CF ikke ble sittende igjen i kolonnen. 2,5 ml hydreringsmiddel ble tilsatt kolonnen så den ikke tørket og kunne gjenbrukes. Samme fremgangsmåte ble benyttet for fjerning av ikke-innkapslet CF i LipoCF-PBS, bare at hydreringsmiddel ble erstattet med PBS.

5.2.3 Partikkelstørrelsesmåling**Hensikt**

Det ble foretatt en partikkelstørrelsesmåling etter gelfiltrering for å bekrefte at liposomene var i ønsket størrelse. Dette var en god indikasjon på om liposomene var intakt, ekstruderingen hadde foregått riktig og/eller om mye CF hadde blitt sittende på utsiden av liposomene etter gelfiltrering.

Fremgangsmåte

Under disse målingene ble det benyttet to instrumenter, Coulter N4 Plus Submicron Particle Size og Zetasizer nano-ZS. Coulter N4 Plus Submicron Particle Size ble benyttet stort sett hele perioden, utenom de to siste gangen da den viste meget høye verdier.

Foton korrelasjon spektroskopi (PCS) ble benyttet for å måle størrelsen. Det ble utført målinger ved vinkel 90° på Coulter N4 og 173° (backscattering) på Zetasizeren.

Innstillingene på Coulter N4 var manuelt valgt til å være ved 25°C , ekvibreringstid på 0,1 minutt, kjøre hver prøve 3 ganger, og analysemetoden som ble benyttet var unimodal (antok at prøvene var en-toppet) som tok for seg gjennomsnitts diameteren til liposomene (nm).

Automatiske innstillingene ble benyttet på ZetaSizer der instrumentet bestemte de ulike parameterene etter typer prøve. Z-average size ble benyttet som mål på liposom diameter (nm). Analysemodellen som ble benyttet var general purpose (normal resolution).

Siden metoden kun ble brukt for å få en grov oversikt ble det ikke foretatt noen valideringer/reproduserbarhets vurdering.

Coulter N4 Plus Submicron Particle Size

Engangskyvetter ble skylt med filtrerte (nuclepore 200 nm) PBS dersom det skulle måles på LipoPBS eller lipoCF-PBS, og hydreringsmiddel ved måling av Lipohydr og LipoCFhydr. Konsentrasjonen på prøveløsningen måtte ligge innenfor $5,0 \times 10^4$ - $1,0 \times 10^6$. For å oppnå dette intervallet ble 1 ml hydreringsmiddel eller PBS til en skylt kyvette, og deretter ble det tilsatt 10 μl liposomer. Det ble foretatt visuell kontroll at kyvetten ikke inneholdt støv. Kyvetten ble temperert i målcellen i fem minutter før tre målinger av hver prøv utført.

Zetasizer Nano-ZS

Engangskyvetter ble skylt med filtrerte (nuclepore 200 nm) PBS eller hydreringsmiddel avhengig av liposom type. 1 ml hydreringsmiddel eller PBS ble tilsatt en skylt kyvette før 20 μl ml liposomer ble tilsatt. Det ble foretatt visuell kontroll at kyvetten ikke inneholdt støv. Kyvetten ble temperert i målcellen i fem minutter før tre målinger av hver prøv utført.

5.2.4 Zetapotensial måling

Hensikt

For å kunne si noe om liposomenes interaksjon med pektin-kitosan kombinasjonsfilmene var det nødvendig å vite zetapotensialet. Zetapotensialet sier også noe om liposomenes oppførsel i hydreringsmiddel eller PBS, samt stabiliteten til liposomene.

Fremgangsmåte

Zetapotensialet ble målt med Zetasizer Nano-ZS Malvern Instruments. Instrumentet og dipcelle ble først kontrollert ved at en standard ble målt. Intervallet på denne standarden skulle ligge innenfor intervallet $-42 \text{ mV} \pm 4,2 \text{ mV}$. Det ble tilsatt 1 ml hydreringsmiddel og 10 μl Lipohydr, før dipcellen ble satt oppi kyvetten på skrått for å unngå luftbobler. Luftbobler kunne forstyrre målinger og gi feil resultater. Mellom hver måling ble dipcellen vasket grundig med destillert vann. Apparatet var innstilt på ekvibrering i 120 sekunder, målingens lengde var satt på automatisk innstilling og fem målinger pr. prøve. I tillegg ble det innstilt på at prøvene var i vann ved 25°C , og instrumentet valgt automatisk viskositeten og dielektrisitetskonstanten. For vann er viskositeten vanligvis 0,89 cP og dielektrisitetskonstanten 79. Analysemodellen som ble benyttet var auto-mode, generell metode som instrumentet velger avhengig av prøven. Siden det ikke var mulig å måle med 100% hydreringsmiddel grunnet høy konduktivitet ble det forsøkt med en gradvis tilnærming som tabellene under viser. Tabell 3 viser måling av zetapotensialet for LipoCFHydr i rent vann, og gradvis økning av hydreringsmiddel eller PBS. Dette ble utført for å se på liposomenes oppførsel i hydreringsmiddel og i PBS, og for å kunne sammenlikne.

Tabell 3: Måling av zetapotensialet til LipoCFhydr med varierende mengde PBS eller hydreringsmiddel, og MilliQ vann.

100 µl LipoCFHydr.	0 µl PBS	0 µl hydreringsmiddel	1 ml milliQ H2O
100 µl LipoCFHydr.	50 µl PBS	50 µl hydreringsmiddel	0,95 ml MilliQ H2O
100 µl LipoCFHydr.	100 µl PBS	100 µl hydreringsmiddel	0,9 ml MilliQ H2O
100 µl LipoCFHydr.	150 µl PBS	150 µl hydreringsmiddel	0,85 ml MilliQ H2O
100 µl LipoCFHydr.	500 µl PBS		500 µl milliQ H2O
100 µl LipoCFHydr.	1000 µl PBS		0 µl milliQ H2O

Det ble også utført målinger på Lipohydr og LipoPBS i PBS for å finne ut zetapotensialet til liposomene i frisettingsmediet.

Tabell 4: Måling av zetapotensialet til Lipohydr med ulik mengde MilliQ vann og PBS.

100 µl Lipohydr	0 µl PBS	1 ml milliQ H2O
100 µl Lipohydr	1 ml PBS	
100 µl Lipohydr	50 µl PBS	0,95ml MilliQ H2O
100 µl Lipohydr	150 µl PBS	0,85 ml MilliQ H2O

Tabell 5: Zetapotensialet til LipoPBS og LipoCF-PBS i MilliQ vann og PBS

100 µl LipoPBS	1 ml MilliQ H ₂ O
100 µl LipoPBS	1 ml PBS
100 µl LipoCF-PBS	1 ml MilliQ H ₂ O
100 µl LipoCF-PBS	1 ml PBS

5.3 Fremstilling og karakterisering av HCl-filmer med liposomer

5.3.1 HCl filmer

Hensikt

Fremstilling av HCl filmer har tidligere vært en suksess [2]. Derfor ble det besluttet å forsøke og tilsette liposomer til slike filmer siden dette ikke er rapportert tidligere, til tross for at det var forventet at liposomene ble ødelagt.

Fremstilling filmer

Fremstilling av frie filmer er en velkjent og enkel metode som gjør det lett å observere egenskapene til polymerene [2, 3, 71]. E.Hagesæther et al. og masteroppgaven til Storfjell-Olven [2, 4] ligger til grunn for filmstøpingsmetoden og oppskriften på HCl filmene. I denne oppgaven ble det kun fremstilt frie filmer av praktisk hensyn.

Innledningsvis ble metodene Storfjell-Oven for filmstøping reproduisert [4] og en del praktiske problemer ble løst bla. tørkeprosessen (vedlegg 3).

12,5 g 1% (w/w) HM-pektinløsning og 37,5g 1% (w/w) kitosanløsning i 0,1M HCl ble laget i hvert sitt begerglass. Dagen etter ble HM-pektinløsningen tilsatt kitosanløsning, og deretter ble 4,5 ml lipoCF-PBS tilsatt og 0,15g glyserol (30% av totale tørrmassen) [3, 72]. Før sammenblanding ble pH-en målt og etter sammenblanding. Denne blandingen stod på magnetrøreren i omtrent 3 timer, før den ble trukket opp med sprøyte og fordelt på tre plastpetriskål-lokk med diameter 5,5 cm. Før fordeling ble en visuell kontroll gjennomført på at alt var løst. Disse lokkene ble satt i granulatskapet på trinn 2 som var satt i vater (en sikring

for å få like tykke filmer), og stod til tørk i 48 timer. Det ble målt temperatur og luftfuktighet før og etter endt tørking da dette kan påvirke tørkeprosessen [73]. Filmene ble deretter tatt ut av petriskålen ved hjelp av en pinsett og lagt på et matpapir som ble satt i en eksikator med 22,5 % RH. Denne RH ble oppnådd ved å mette eksikatorene med kaliumacetat [74]. Filmene lå i eksikator i minst 48 timer før det ble benyttet i videre forsøk. Dette trinnet var nødvendig for å sikre likt fuktinnhold i alle filmene [73]. Samme fremgangsmåte ble benyttet til å lage filmer innholdende kun CF. Det ble tilsatt 0,012 mM CF-løsning.

5.3.2 Frisetting

5.3.2.1 Gjennomstrømningscelle

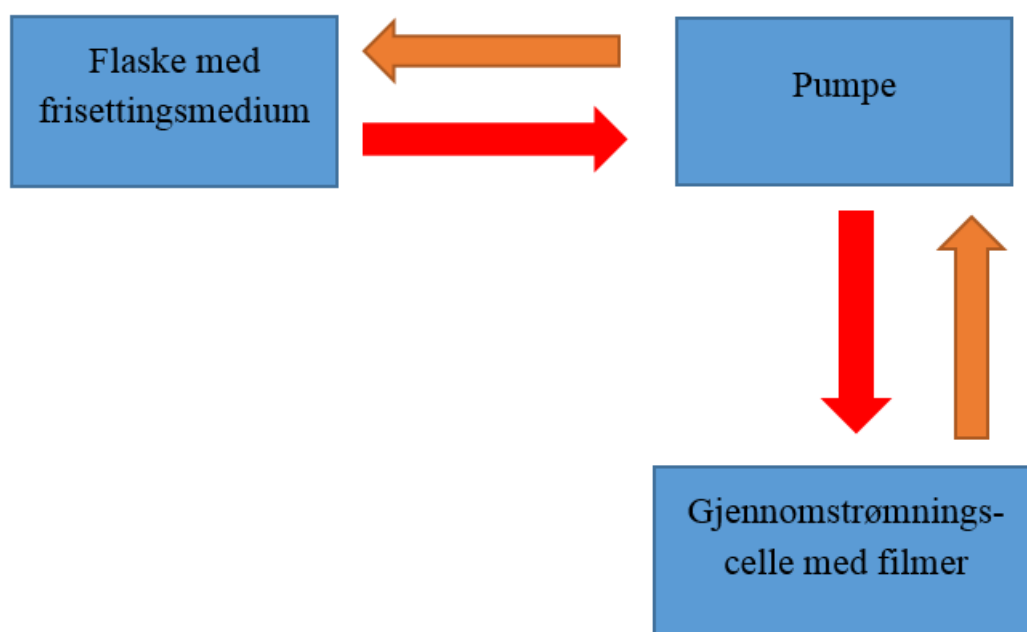
Hensikt

Undersøkes frisettinghastigheten av CF ut fra liposomene gjennom filmene til frisettingsmediet-PBS ved å måle fluoresensenintensiteten.

Fremgangsmåte

Dagen før frisettingsforsøk skulle gjennomføres ble destillert vann benyttet til å rense systemet. Pumpehastigheten ble innstilt på 8 ml/min som ble finjustert før forsøket skulle kjøres. Dette ble gjennomført før hvert forsøk. Gjennomstrømningscellene ble tatt ut og lagt til tørk, slik at filmene ikke klistret seg til den våte overflaten. Tilhørende vannbad ble innstilt på 37 °C og på forsøksdagen ble det slått på tidlig. Tre tørket filmer fra samme batch innholdende lipoCF-PBS og fremstilt fra i 0,1M HCl polymerløsning, ble plassert i hver sin gjennomstrømningscelle. Tre glassflasker à 100 ml ble fylt med 100 ml 0,2 M PBS

(frisettingsmedium) og koblet med hver sin gjennomstrømningscelle. (Figur 9).



Figur 9: Frisettingsoppsettet der frisettingsmediet i flaksen ble pumpet gjennom slanger til gjennomstrømningscellen, og pumpet tilbake igjen til flasken.

Bufferkapasiteten til PBS hadde blitt på forhånd verifisert, se vedlegg 4. Det ble tatt ut prøver fra PBS etter bestemte tidsintervaller og fluorescensen ble målt ved hjelp av en plateleser. I kapittel 5.3.2.2 står det beskrevet utfyllende om dette. Etter endt forsøk ble det kjørt basisk såpe igjennom i ca. 15 minutter og deretter ble det kjørt springvann igjennom systemet i 3 timer. CF er godt løselig i basisk pH, dermed sikret man at alle rester ble fjernet ved å benytte basisk såpe [63, 75].

5.3.2.2 Fluorescens måling

Tillaging av standardrekker

En ny standardrekke ble laget hver gang fluorescensmålinger skulle foretas. Tillagingen foregikk under beskyttelse mot lys.

CF 1,5 mM (kap 4.3.4) laget i hydreringsmidlet eller PBS avhengig av liposomtype. Dersom det hadde gått noen uker i mellom tillagingen av denne løsningen, ble en ny løsning laget. Det ble foretatt fortynning av 1,5 mM CF til 12 μM . Det ble overført 500 μl 12 μM og 500 μl PBS til 1,5 ml eppendorfrør, og blandet med pipetten ved at løsningen ble dratt opp og ned 5-6 ganger. Fra dette eppendorfrøret ble det overført 500 μl til et nytt eppendorfrør, og tilsatt 500 μl PBS. Vanligvis ble det fortynnet videre i 12 nye eppendorfrør der konsentrasjonen på standardkurven lå mellom 6 μM til 0,0015 μM . Dersom standardkurven ikke dekket hele

frisettingsområdet ble flere fortynninger utført. Ettersom plateleseren ikke klarte å lese høyere konsentrasjoner enn 6 μM ved lysstyrke 2000 ble det ikke fortatt målinger ved høyere konsentrasjoner.

Prøveløsninger og utpipettering på plate

Under hele frisettingsforsøket ble flaskene, standardfortynningen og prøveløsningene beskyttet mot lys både under og etter utpipettering. Det ble utpipetert 100 μl standardløsning i brønner på en hvit plate. For hver konsentrasjon ble det utpipetert tre replikater. Det ble tatt ut 50 μl prøveløsning fra hver flaske etter 5, 15, 30, 60, 90, 120 og 150 minutter og deretter ble det tilsatt 50 μl PBS til hver brønn. Det ble også ved samme tidsintervall tatt ut 50 μl prøveløsningen som det ble tilsatt 50 μl triton-X 100 2% (kapittel 4.3.4). Det ble også tatt 100 μl PBS, og 50 μl triton- X 100 2 % og 50 μl PBS ved hvert tidsintervall. Dette ble gjort for å undersøke fluorescensen til bakgrunnen. Under utpipetteringen var det svært viktig å ikke få noen bobler i brønnene, da dette gav feil resultater. Triton-X 100 har en tendens til å skumme fort siden den er ikke-ionisk surfaktant, noe man måtte vært observant på [76, 77]. For testing av filmer innholdende CF ble prøveuttakene utført på lik måte, men delen med triton ble ikke utført da det ikke var noen liposomer tilstede.

Fluorescensen brønnene gav ut ble målt ved hjelp av Wallac Victor³ 1420 Multilabel Counter. Instrumentinnstillingene var følgende:

Tabell 6: Instrumentinnstillinger ved fluorescensmåling [70].

Teknologi og platetype	Teknologi: Prompt fluorometry Plate: Hvit, 12 x 8 brønner Tid pr. måling: 0,1 sek Antall målinger av hver plate: 1
Risteparametere	Ristevarighet: 3 sekunder Ristehastighet: Fast Ristediameter: 0,1 mm Ristetype: Linear
Lampe og filter	Filter emisjon: F535 Filter eksitasjon: E485 Lampeenergi CW-lampe: 2000 Emisjonsside: Ovenfra

Kvantifisering

Ved hjelp av standardrekken ble fluorescensintensiteten som programvaren for plateleseren oppgav konvertert til μM .

5.3.2.3 Q-test

Hensikt

Når en enkelt måling avvike betydelig fra resten av resultatene, ble Q-test benyttet for å vurdere om parallellen burde forkastes [78].

Fremgangsmåte

Målingene ble ordnet etter stigende tallverdi, $x_1, x_2, x_3 \dots x_i, x_{kri}$ der nest største verdien er x_i og x_{kri} er den største verdien (forkastningsverdien) (motsatt om forkastningsverdien var mindre). Deretter ble formelen $Q = (x_i - x_{kri}) / (x_1 - x_{kri})$ brukt til å beregne Q-verdien der %-frisetting var grunnlaget for vurderingen. Ettersom det ble kjørt tre paralleller ved hver tid og ønsket konfidensnivå var satt til 96% ble følgende verdi avlest fra tabell i Legemiddelanalysyboka 0,98 [78]. Dersom de beregnede Q-verdiene var større enn avlest verdi, kunne målingen forkastes.

5.4 Metodeutvikling for fremstilling av filmer ved nøytral pH

Ved $\text{pH} > 3$ er både pektin og kitosan ladet i større og mindre grad siden pK_a er hhv 3,5-4,5 og 6,2-7,0 som beskrevet under teoridelen. For å få oversikt over systemet ble det laget ulike buffersystem for å oppnå ulike pH-er i området 2-8. Deretter ble det undersøkt om det var mulig å skjerme ladningen på pektin/kitosan ved tilsetning av et flyktig salt slik som Jindal M. et al. beskriver i litteraturen [79]. Den tredje mekanismen for å hindre for tidlig geldannelse var tilsetning av urea for å bryte H-bindinger. Hensikten med disse innledende forsøkene var å undersøke ulike kombinasjoner for å skaffe en oversikt over systemet, og etablere fornuftige nivåer for faktorene slik at det senere kunne genereres et forsøksdesign for å optimalisere filmdannelsen slik at liposomer kan innkapsles. Liposomer er svært følsomme for pH, og liker seg trolig best ved nøytral pH [80].

5.4.1 Buffer

Fremgangsmåte

Filmer i fosfatbuffer

Det ble laget løsninger ved pH 2.1, 2.8, 3.4, 7.0 og 8.0 ved hjelp av ulike fosfatsalter som er beskrevet i kapittel 4.3.2. Det var ønskelig å løse HM-pektin og kitosan med samme løsemidlet.

Filmfremstillingen er beskrevet tidligere i oppgaven (kapittel 5.3.1), men med tilnærmet 1% polymerløsninger. 0,75 HM-pektin ble løst i 75 g fosfatbuffer pH 2,1 og 2,25 g kitosan ble løst i 225g fosfatbuffer pH 2,1 i hvert sitt begerglass. På samme måte ble det utført med de andre fosfatbufferene. Oppløsningen ble utført under omrøring på magnetrøreren, trinn 7 (trinn 10 tilsvarer 1200 rpm), over natten. HM-pektinløsningen ble tilsatt kitosanløsning og deretter ble 0,9 g glyserol tilsatt. Tilsettingen var ikke kontrollert, alt ble tilsatt med en gang. Før sammenblanding ble pH-en målt og etter sammenblanding. Denne blandingen stod på magnetrøreren i omtrent 3 timer, før den ble støpt i 22,5 *22,5 cm petriskål. Før fordeling ble det gjennomført visuell kontroll på om alt var løst. Videre utførelse ble gjort som beskrevet i kapittel 5.3.1.

Filmer i vinsyrebuffer

På grunn av lav bufferkapasitet var det vanskelig å lage en fosfatbuffer med lav ionestyrke i pH-området 3-4. Dette henger sammen med at pKa til dihydrogenfosfat er 2,12 og 7,21 for hydrogenfosfat [81]. Derfor ble disse pH-ene oppnådd ved å lage vinsyrebuffer (kapittel 4.3.2). Filmene ble laget på samme måte som filmene i fosfatbuffer.

Løse kitosan i destillert vann

Det ble også undersøkt om vann kunne være et egnet løsemiddel for kitosanen. 2,25 g kitosan ble forsøkt løst i 225 g destillert vann.

5.4.2 Ladningsskjerming

Fremgangsmåte

For at det skal være lettere å finne tilhørende resultater, har det blitt benyttet nummerering 1a-1d under.

Ammoniumacetat i vinsyre

Siden det i artikkelen til Jindal M. et al. [79] ikke blir beskrevet noe eksakt mengder, ble det laget 5 M ammoniumacetatløsning som et utgangspunkt. Det ble besluttet å tilsette 5 M ammoniumacetat i vinsyrebuffer pH 3, siden pH lå rundt 5,5 etter sammenblanding med denne bufferen. Denne pH-en var ønskelig siden man tenkte at både HM-pektin (pka 3,5-4,5) og kitosan (pka 6,2-7,0) [31, 47] var ladet og løselig ved denne pH-en. HM-pektin- og kitosanløsningen ble laget som beskrevet tidligere med unntak av at det ble tilsatt hhv 3 g og 10 g 5 M ammoniumacetat til avveid vinsyrebuffer pH 3, før det stod over natten på røring. Det ble antatt at ammoniumacetatet ville bidra til at det ikke dannes gel før løsningen tørket, og ettersom filmen tørker vil ammoniumacetat fordampe. Resten ble utført som beskrevet i kapittel 5.3.1. Det ble laget totalt tre slike filmer for å bekrefte resultatet (1a), men det ble kompensert for at det ikke ble tilsatt ad. med buffer, men hhv 75 og 225g. Av den grunn ble de nye mengdene 0,79 g HM-pektin og 2,38 g kitosan. Det ble i tillegg forsøkt med vinsyrebuffer pH 4 i stedet for pH 3(1a). Nye batcher med kitosan og HM-pektin ble tatt i bruk og det er disse som ble benyttet videre i oppgaven. Det ble laget noen ekstra filmer for å undersøke om de nye batchene innvirket på filmene.

Det viste seg i foregående resultater at 5 M ammoniumacetat bestemte pH-en i løsningene. Av den grunn ble det forsøkt å løse ammoniumacetat i vann (1b) og bruke det som løsemiddel for HM-pektin og kitosan. Resten ble utført som beskrevet over med de nye mengdene HM-pektin og kitosan.

Det ble forsøkt å tilsette 5 g av 5 M ammoniumacetat istedenfor 10 g til kitosan (1c) for å se om det gav bedre resultater, men fremgangsmåten og resten av tilsetnings mengdene er som beskrevet over. Siden dette ikke var til hjelp ble det forsøkt å bryte H-bindinger ved å tilsette ca. 4 g urea etter 3 timers røring.

Ulike løsemidler for HM-pektin og kitosan (1d)

2,25 g Kitosan ble løst i 225 g 0,1M HCl og 0,75 g HM-pektin ble løst i 62 g destillert vann og resten ble utført som tidligere beskrevet. Dagen etter ble 13 g 5 M ammoniumacetat tilsatt HM-pektinløsningen. Tilslutt ble glyserolen tilsatt. Trolig ble det dannet, etter 1 times røring, H-bindinger ettersom løsningen var klar til å starte med. Videre ble det forsøkt å bryte disse bindingene, løsningen ble delt i ca. like store deler, og deretter ble en del varmet på, en annen ble det tilsatt ca. 15 g ammoniumacetat. Til den tredje delen ble det tilsatt ca. 1,2 g urea og

siste delen ble rørt kraftig med stavmikser. Det ble valgt glass petriskåler med diameter 9,5 cm til støpning av filmene. Mengde urea som ble benyttet for å bryte H-bindinger var beregnet ut fra en tidligere studie tok for seg samme type brytning i hydrogeler [82]. Tørkeprosessen og eksikatorprosessen ble utført på lik måte som før.

Det ble også undersøkt tidsrommet løsningen er på magnetrøreren er av betydning. Det ble løst 0,75 g kitosan i 75 g 0,1M HCl og 0,25 g HM-pektin ble løst i 25 g 5 M ammoniumacetat. Det ble tilsatt 0,3 g glyserol og deretter ble 50 g løsning rørt i 2 minutter før støping. De andre 50 g-ene ble rørt i 30 minutter før støping. Resten ble utført som tidligere beskrevet.

5.4.3 Optimalisering av filmer

Faktorforsøk- Screening

Hensikt:

Undersøke effekten følgende faktorer har på filmene: 1) Tilsetting av urea til HM-pektinløsningen, 2) tilsette ammoniumacetat til HM-pektinløsningen, 3) varme både HM-pektin- og kitosanløsningene før sammenblanding, 4) tidsrom for røring etter sammenblanding og 5) tørke temperatur. Faktorene ble undersøkt i et faktorforsøk på to nivåer. Dette forsøket var et screeningforsøk, designet som et redusert faktorforsøk 2^{5-2} med senterpunkter.

Fremgangsmåten:

37,50 g 1 % (w/w) kitosan ble løst i 0,1M HCl og 12,5 g 1% HM-pektin ble løst i destillert vann med varierende mengde tørrstoffene urea og ammoniumacetat, vist i tabell 7. Disse løsningene stod på magnetrøreren over natten på trinn 5 (trinn 10 tilsvarer 1200 rpm). Dagen etter ble pH målt før løsningene enten ble varmet opp eller ikke. Deretter ble de sammenblandet ved at kitosanløsningen ble tilsatt HM-pektinløsningen, før 0,15 g glyserol ble tilsatt. Løsningen ble så rørt i ulik tid og støpt ved ulike temperaturer. Det ble støpt i glasspetriskåler à 9,5 cm i granulatskapet. Temperaturen og luftfuktigheten ble avlest før og etter endt tørkeprosess. Tabellene under viser utdyper fremgangen.

Tabell 7: Oversikt over faktorene undersøkt i faktorforsøk for filmer ved nøytral pH.

Faktor	Forkortelser	Nivå	
Tilsetting av urea til HM-pektin	Urea	0,0 g	0,8 g
Tilsetting av ammoniumacetat til HM-pektin	Am.ac	0,75 g	5.0 g
Varme løsningene	Varme	RT	40 °C
Rørelengde	Røring	5 min	60 min
Tørke temperatur, granulatskap	Tørk-temp.	RT	40 °C (1000 watt)

*RT = romtemperatur

Det konstante prosess- og formuleringsfaktorer i forsøket er oppsummert i tabell 8.

Tabell 8: Konstante prosess- og formuleringsfaktorer for faktorforsøket for filmer ved nøytral pH

Polymer konsentrasjonen	1%
Kitosan løsemiddel	0,1 M HCl
HM-pektin løsemiddel	Destillert vann
Pektintype:	HM-pektin
Kitosantype:	Medium molecular weight
Rørehastighet	5 (10 tilsvarer 1200 rpm)
Støpt i glass petriskåler	Diameter 9,5 cm

Forsøktoppsettet er vist i tabell 9. Designet ble satt opp ved hjelp av programmet MODDE 9.1, Umetrics AB.

Tabell 9: Forsøksoppsett for alle filmene som ble laget

Designprøve	Urea	Am.ac	Varme	Røring	Tørk- temp.
1.	0,0 g	0,75 g	RT	60 min	40 °C
2.	0,0 g	5,0 g	RT	5 min	RT
3.	0,8 g	0,75 g	RT	5 min	40 °C
4.	0,8 g	5,0 g	RT	60 min	RT
5.	0,0 g	0,75 g	40 °C	60 min	RT
6.	0,0 g	5,0 g	40 °C	5 min	40 °C
7.	0,8 g	0,75 g	40 °C	5 min	RT
8.	0,8 g	5,0 g	40 °C	60 min	40 °C

*RT = romtemperatur

Rekkefølgen på dette ble ikke randomisert ettersom dette ble utført på samme dag. Det ble også utført fire 0-prøver samme dagen som beskrevet i tabellen 10.

Tabell 10: Midt punktene for faktorforsøket

Designprøve	Urea	Am.ac	Varme	Røring	Tørk- temp.
9.	0,4 g	3,0 g	32,5 °C	30 min	RT
10.	0,4 g	3,0 g	32,5 °C	30 min	RT
11.	0,4 g	3,0 g	32,5 °C	30 min	40 °C
12.	0,4 g	3,0 g	32,5 °C	30 min	40 °C

*RT = romtemperatur

Responsvariabelen som ble studert var følgende:

- pH i kitosan-, HM-pektinløsning og etter sammenblanding
- Utseende – skalering av hvor blanke de var etter tørking
- Tykkelse, vekt og puncture test. Dette ble utført på filmer hvor det var mulig å gjennomføre disse testene.

Utseende ble det foretatt en visuell vurdering av, og pH-en ble målt ved hjelp av pH-måler.

Tykkelsen ble målt med et mikrometer, og finvekt ble benyttet til å veie filmbitene.

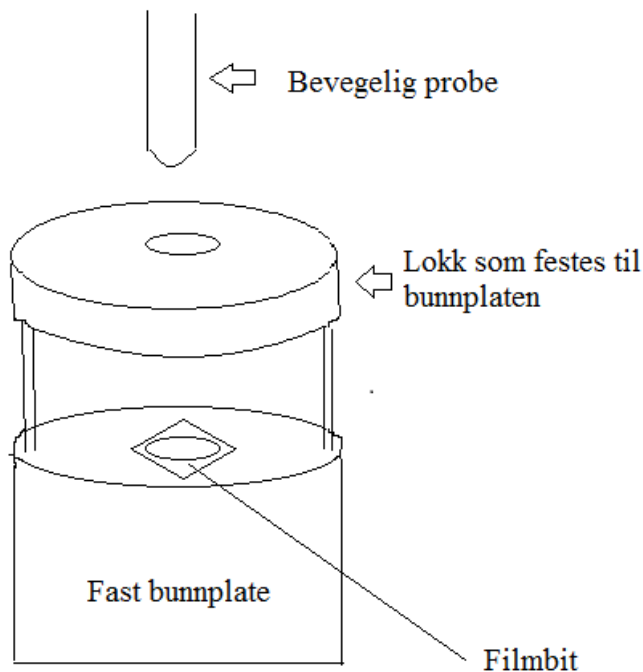
Puncture test:

Det ble skjært ut en passende filmbit ca. 2,5 * 2,5 cm ettersom diameteren på hullet var 1,4 cm. Instrumentet ble innstilt på parameterne som tabell 11 beskriver.

Tabell 11: Tesksturmåler innstillinger for puncture-test

Test mode and options	Measure force in compression Hold until reset.
Parameters	Pre teste speed: 1,00 mm/s Test speed: 0,03 mm/s Post test speed: 1,00 mm/s Rupture test distance: 0,5 mm Distance: 100 mm Force: 2,000 N Time: 100,00 sec Count: 5
Trigger	Auto Force: 0,070 N
Break	Detect: return level Sensitivity: 0,100 N Stop plot at: Final
Units	Force: N Distance: mm

Før måling ble kraften til teksturemåleren kalibrert ved hjelp av et lodd. Filmbiten ble plassert over hullet med en pinsett. Lokket ble satt på filmbiten og skrudd fast til bunnplaten som vist i figur 10.



Figur 10: Puncture-test oppsettet. På bunnplaten plasseres filmbiten og lokket festes fast ved hjelp av skruer til bunnplaten. Den bevegelige proben vil etter gitte innstillinger senkes nedover inntil filmen brytes.

5.4.4 Optimaliseringsdesign-Mixed level

Hensikt

Basert på screeningdesign ble det utarbeidet et optimaliseringsdesign for å oppnå enda bedre filmkvalitet.

Fremgangsmåte

Det ble utført på samme måte som beskrevet i kapittel 5.4.3. Ettersom temperaturen og røre tidsrom ikke viste seg å være betydelig ble det nye faktorforsøket kun basert på i mengde urea og ammoniumacetat som tabellen 12 viser.

Tabell 12: Forsøksoppsett for ekstra faktorforsøk

Faktorer			Konstant		
Designprøve	Urea	Am.ac	Varme	Røring	Tørk- temp.
1.	0,0 g	3 g	RT	5 min	RT
2.	0,4 g	0,75 g	RT	5 min	RT
3.	0,2 g	1,875 g	RT	5 min	RT
4.	0,8 g	2,0 g	RT	5 min	RT
5.	1,2 g	2,0 g	RT	5 min	RT
6.	1,2 g	* 2,167 g	RT	5 min	RT
7. **	1,2 g	2,167	RT	5 min	RT
8. **	1,2 g	0 g	RT	5 min	RT

* 5 M ammoniumacetat kapittel 4.3.2.

** Annen fremgangsmåte, se under.

Forsøk 7 fremgangsmåte: 0,125 g HM-pektin løst i 10,34 g destillert vann ved at disse løsningene stod over natten på magnetrøreren, hastighet 5. Sammenblandingen foregikk ved at HM-pektinløsningen ble tilsatt kitosanløsningen som var laget helt likt som tidligere, og deretter ble 0,15 g glyserol tilsatt. Dette stod på røring i ca. 1 time før 2,167 g 5 M ammoniumactatløsning og 1,2 g urea ble tilsatt. Løsningen stod ytterligere 30 minutter på magnetrøreren hastighet trinn 5.

Forsøk 8 fremgangsmåte: Det ble også forsøkt å gjøre akkurat det samme enda en gang, men uten å tilsette ammoniumacetat. Før tilsetting av urea stod løsningen på magnetrøreren på hastighet trinn 5 i 1 time, og etter tilsetting av urea stod det på hastighet 5 i 1 time, og 30 minutter på maks hastighet, 1200 rpm.

I tillegg ble det også forsøkt å lage filmer på følgende måte:

Det ble løst 0,125 g HM-pektin, 0,4 g urea og 0,835 g ammoniumacetat i ad 12,5 g destillert vann som stod over natten på magnetrører, og kitosanløsningen som tidligere beskrevet. Sammenblandingsfasen foregikk ved at kitosan ble tilsatt HM-pektinløsningen og deretter ble 0,15 g glyserol tilsatt. Det ble også forsøkt å lage en filme der det ble tilsette 4,5 ml Lipohydr til HM-pektinløsningen før kitosanløsningen ble tilsatt. Resultatene av dette pekte i retningen av at tilsettingen av kitosanløsningen til HM-pektinløsningen måtte foregå under kontrollerte betingelser. Derfor ble det besluttet å tilsette kitosanløsningen porsjonsvis; 5 ml porsjoner ble ved hjelp av en sprøyte langsomt (ca. 15 sek) tilsatt HM-pektinløsningen med 5 minutters mellomrom før 0,15 g glyserolen ble tilsatt og i rørt 5 minutter. Hele ferdig løsningen ble dratt opp med en sprøyte og fordelt på 3 petriskål-lokk med diameter 5,5 cm. Resten ble utført som tidligere beskrevet. Med unntak av at filmene måtte tørke i granulatskapet i 72 timer, i stedet for 48 timer. Dette viste seg å være en vellykket fremgangsmåte.

Puncture test

Det ble foretatt puncture test av filmene laget ved forsøk 7 og 8, og de sist nevnte som ble fremstilt under kontrollert sammenblanding.

5.5 Fremstilling og karakterisering av nøytrale CF-filmer med og uten liposomer

5.5.1 Nøytrale filmer med og uten liposomer

Fremgangsmåte

Det ble løst 0,375 g kitosan i 37,5 g 0,1 M HCl og 0,125 g HM-pektin ble løst i 0,4 g urea, 0,835 g ammoniumacetat og ad 12,5 g destillert vann ved romtemperatur. Oppløsningen ble utført under omrøring på magnetrører over natt, hastighet trinn 5 (trinn 10 tilsvarer 1200 rpm). pH-en ble målt i begge løsningene før kitosanløsningen ble dratt opp med en passende sprøyte og mengden avlest. 4,5 ml LipoCFhydr ble tilsatt HM-pektinløsningen før porsjoner av 5 ml kitosanløsningen ble tilsatt HM-pektinløsningen langsomt (ca. 15 sekunder) med 5 minutters mellom hver porsjon. Glyserol ble deretter tilsatt og rørt inn i 5 minutter. pH-en ble målt i den sammenblandede løsningen. Hele løsningen ble dratt opp med en sprøyte og tilnærmet 16,7 ml løsning ble tilsatt hver plastpetriskåler-lokk à 5,5 cm (3 stk. totalt). Dette foregikk i granulatskapet der kun viften var satt på. Temperatur og luftfuktighet ble avlest før og etter

støpeprosessen. Disse filmene lå til tørk i 48 timer før ytterligere utvidelse til 72 timer. De ble deretter satt i eksikator som beskrevet tidligere i minst 48 timer. Filmer uten liposomer med CF ble utført på samme måte, med unntak av at CF løsningen ble tilsatt HM-pektinløsningen før kitosanløsningen ble tilsatt porsjonsvis. Det ble kjørt 6 paralleller av hver filmtype (med liposomer og uten). Tre av parallellene med bare CF var tilsatt 4,5 ml 1,5 mM CF, mens tre andre var tilsatt 0,6 mM.

Det ble kjørt frisettingsforsøk på disse filmene som beskrevet i kapittel 5.3.2.

5.5.2 Frisetting av CF fra liposomer til PBS

Fremgangsmåte

For å undersøke tettheten av liposomer ble denne metoden benyttet. Til tre glassflasker ble det tilsatt 100 ml PBS i hver, og disse ble satt i varmeskap som var innstilt på 37 °C.

Temperaturen ble målt med et digitalt termometer før forsøket ble startet. Før hoved forsøket ble sentrifugerørene vasket ved at litt PBS ble tilsatt og sentrifugert i 5 minutter. Sentrifugen var innstilt på 20 °C og 7197 rpm, og denne innstillingen ble benyttet gjennom hele forsøket. Sentrifugerørene ble satt i 5 minutter i kjøleskapet etter vasking, før og etter sentrifugering for å oppnå raskere romtemperatur på prøveuttakene. Rett etter tilsetning av liposomene (1,5 ml LipoCFhydr til hver flaske) ble det tatt ut prøver av 1 ml fra hver flaske og overført til sentrifugerørene. Dette skulle være nullprøven. Etter 5 minutters sentrifugering og temperering ble det tatt ut 100 µl fra hver av rørenes supernatant som ble pipettert ut i hver sin brønn på en hvit plate. 100 µl PBS ble også utpipettert i en brønn som var en bakgrunnsstøymåling. Sentrifugerøret ble vasket igjen med PBS, og Vortex ble brukt til å løsne restene før de ble satt i kjøleskap. Det ble tatt ut prøver etter 30 minutter, 1 time, 1,5 time, 2 timer, 2,5 time og videre utførelse var som for nullprøven, med unntak av at sentrifugeringstiden ble redusert til 2 minutter. Etter 2,5 time ble det tatt ut 100%- prøve ved at 500 µl prøve fra hver flaske ble tilsatt tre eppendorfrør. Tempereringen ble utført på lik måte som beskrevet over. 50 µl prøveløsning fra hvert eppendorfrør ble tilsatt hver sin brønn på platen og 50 µl triton ble tilsatt i disse brønnene. Standardkurver, kvantifisering og Q-test ble utført som beskrevet i kapittel 5.3.2.

5.5.3 Oppløsning av filmer etter endt frisettingsforsøk

Hensikt

Etter endt frisettingsforsøk med CF-filmer med liposomer var det ønsket å finne ut hvor mye CF det var igjen i hver film. Filmene ble av den grunn forsøkt løst for å få en mer nøyaktig innkapslingsgrad.

Fremgangsmåte

Filmene ble tatt ut fra gjennomstrømningscellen med en pinsett og ble plassert i hvert sitt begerglass som det allerede hadde blitt tilsatt 50 ml PBS pH 7. Begerglassene ble satt inn i varmeskap som var innstilt på 45 °C og ble stående over natt. De ble så satt på ultralydbad med 50 °C på vannet 2*15 minutter. En av filmene ble deretter overført til 100 ml 0,1 M HCl pluss 10 ml 2 M HCl ble tilsatt slik at pH-en ble 1,26. Blandingen stod over natt på maks hastighet, 1200 rpm . Denne blandingen stod deretter i 14 dager på lab-benken. Liten bit av de to andre gjenstående filmene ble det tilsatt tre pasteurpipette, glass 37% HCl, en annen bit av samme film ble det tilsatt 10 ml 2 M NaOH. Siste filmen ble forsøkt løst opp med stavmikser, og det ble tilslutt forsøkt å tilsette 10 g NaCl til denne for å skjerme ladningene.

6. Resultater

6.1 Opprensing og molekylvekt bestemmelse av pektin

6.1.1 Opprensing av pektin

Utbyttet av rensset pektin var ca 12 g pr. 1000 ml 1,5% (w/v) HM-pektin løsning.

6.1.2 Molekylvekt bestemmelse av pektin

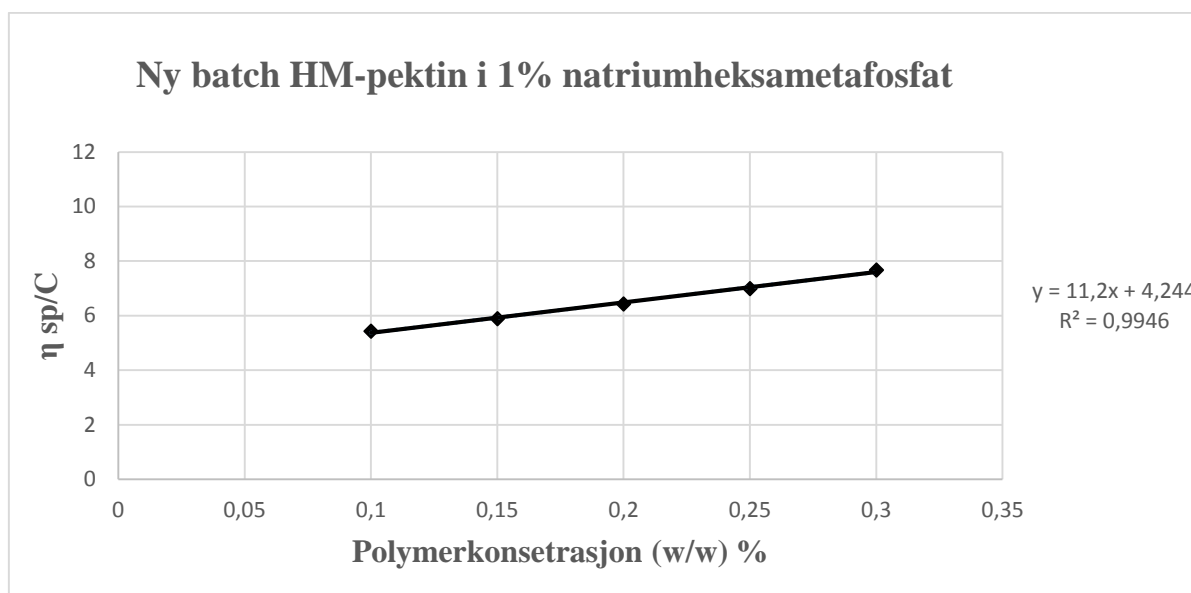
Hugginskonstant ble bestemt ved å måle utrenningstidene til de ulike fortynningene av HM-pektin i 1 % natriumheksametafosfat. Disse tidene ble også benyttet til å estimere molekylvekten til HM-pektin.

Gamle batchen med HM-pektin

Tabell 13: Utrenningstider for gammel batch HM pektin. Utrenningstidene er et gjennomsnitt av n=3 målinger, konsentrasjonen angis i w/w %.

Konsentrasjon	Utrenningstid (sek.)	Min/ maks (sek.)	η_{rel}	η_{sp}	$\eta_{sp/C}$
0,10 %	52,17	52,17 /52,17	1,54	0,54	5,43
0,15 %	63,70	63,70 / 63,71	1,88	0,88	5,89
0,20 %	77,31	77,30 / 77,32	2,29	1,29	6,43
0,25 %	92,93	92,90 / 92,99	2,75	1,75	6,99
0,30 %	111,72	111,66 / 111,83	3,30	2,30	7,68

Utrenningstiden til 1% natriumheksametafosfat var 33,82 sekunder med min/maks på 33,81/33,83 sekunder.



Figur 11: Redusert viskositet plott mot polymerkonsentrasjon der skjæringspunktet til den rette linjen er $[\eta]$ og stigningstallet er $k'[\eta]^2$ (Tabell 13)

Formelen $\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 \times C$ ble benyttet til å beregne hugginskonstant som for den gamle batchen var 0,624. Theta betingelser oppnås dersom hugginskonstant ligger innenfor 0,5 -0,7. I dette tilfellet lå den gamle batchen innenfor som vil si at det er like mye frastøtende og tiltrekkende krefter i systemet [83]. Dette bekrefter igjen at 1 % natriumheksametafosfat er et godt løsemiddel, noe som gjenspeiler annen litteratur [3, 39]. Mark-Houwink- Sakuradas likning: $[\eta] = K \times Mv^\alpha$ ble brukt til å beregne molekylvekten med benevnning g/100ml. De empiriske konstantene α og k var satt til 1 og $4,7 \times 10^{-5}$ [84]. Molekylvekten ble $9,0 \times 10^4$, noe som er lavere enn Storfjell-Ove fikk på samme batch [4], men likevel i overensstemmelse med annen litteratur [85].

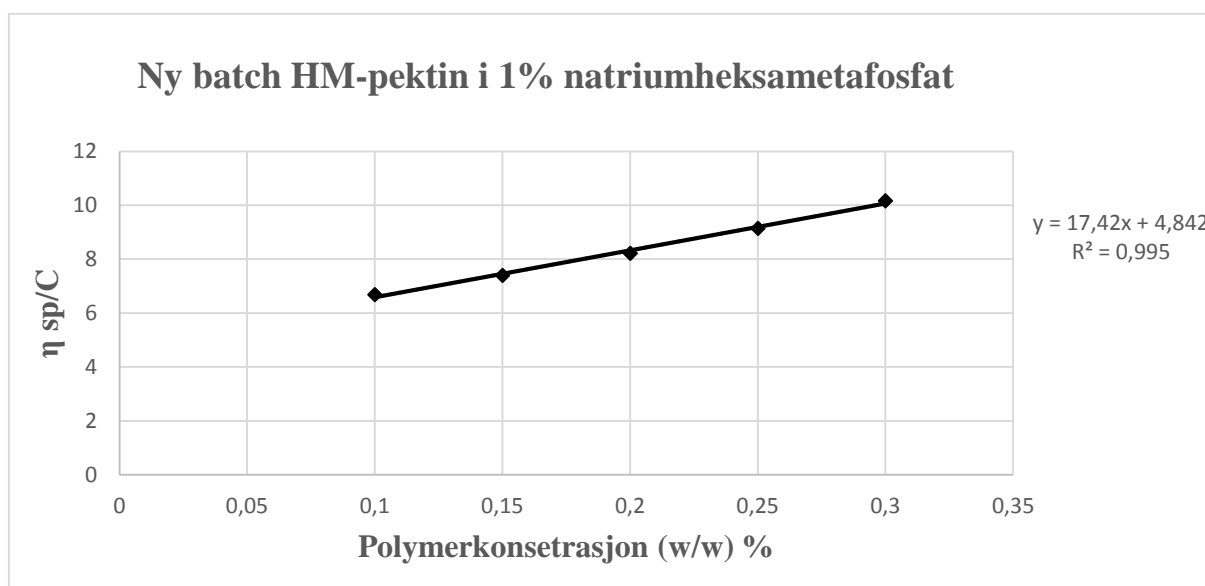
Nye batchen med HM-pektin

Det samme ble gjennomført med den nye batchen HM-pektin for å kunne sammenlikne eventuell endring i størrelse.

Tabell 14: Utrenningstider for ny batch HM pektin. Utrenningstidene er et gjennomsnitt av $n=3$ målinger, konsentrasjonen angis i w/w %.

Konsentrasjon	Utrenningstid (sek.)	Min/ maks (sek.)	η_{rel}	η_{sp}	$\eta_{sp/C}$
0,10 %	56,38	56,38 / 56,38	1,67	0,67	6,69
0,15 %	71,25	71,25 / 71,26	2,11	1,11	7,40
0,20 %	89,35	89,34 / 89,36	2,64	1,64	8,22
0,25 %	111,08	111,07 / 111,09	3,29	2,29	9,15
0,30 %	136,87	136,82 / 136,91	4,05	3,05	10,17

Utrenningstiden til 1% natriumheksametafosfat var 33,78 sekunder med min/maks på 33,78/33,78 sekunder.



Figur 12: Redusert viskositet plott mot polymerkonsentrasjon der skjæringspunktet til den rette linjen er $[\eta]$ og stigningstallet er $k'[\eta]^2$ (Tabell 14).

Hugginskonstant ble beregnet til 0,7457, noe høyere samtidig som det theta-betingelser. Molekylvekten ble funnet til å være $1,0 \cdot 10^5$. Med dette kan det bekreftes at de nye batchen har tilnærmet lik molekylvekt som den gamle batchen hadde i utgangspunktet [4].

6.2 Størrelses- og zetapotensiale målinger av liposomer

6.2.1 Størrelsesmålinger

Lipohydr

Det ble produsert 5 ulike soya-PC liposomer som beskrevet i kapittel. 5.2.1. Resultatene fra størrelsesmålingene av Lipohydr er avgitt i tabell 15.

Tabell 15: Gjennomsnittsstørrelsen $n=3$ for Lipohydr med +/- verdi fra gjennomsnittsstørrelsen

Lipohydr batcher	1.	2.	3.	4.	5.
Gjennomsnittlig størrelse dagen etter ekstrudering med +/-	218,6 nm (2,2;1,0)	212,9 nm (2,2;2,5)	210,6 nm (0,2;0,2)	216,9 nm (20,5;17,6)	198,9 nm (3,9;5,2)

Alle målingene i tabell 15 ble fortatt på Coulter N4 pluss, utenom batch 5 som ble utført på Zetasizer. Årsaken til dette var at instrumentet gav urimelige resultatet derfor ble det byttet. Batch 1 ble målt samme dag som ekstruderingen ble utført og størrelsen var da 214 nm. Tre dager etter ekstruderingen ble størrelsen til batch 4. målt. Størrelsen ble målt til å være 261,5 nm, kan tyde på at liposomene er ødelagt.

LipoCFhydr og lipoCF-PBS

Det ble foretatt størrelses måling for 4 batcher av LipoCFhydr og kun en måling av lipoCF-PBS.

Tabell 16: Gjennomsnittsstørrelsen $n=3$ for LipoCFhydr, samt en måling av LipoCF-PBS med tilhørende +/- verdi fra gjennomsnittsstørrelsen.

LipoCFhydr batcher	1.	2.	3. *	4. *	5. (LipoCF-PBS) *
Gjennomsnittlig størrelse dagen etter ekstrudering med +/-	206,1 nm (33,3;17,5)	230,2 nm (1,6;1,6)	195,8 nm (1,6;2,0)	195,3 nm (3,4;4,1)	204,1 nm (0,6;0,4)

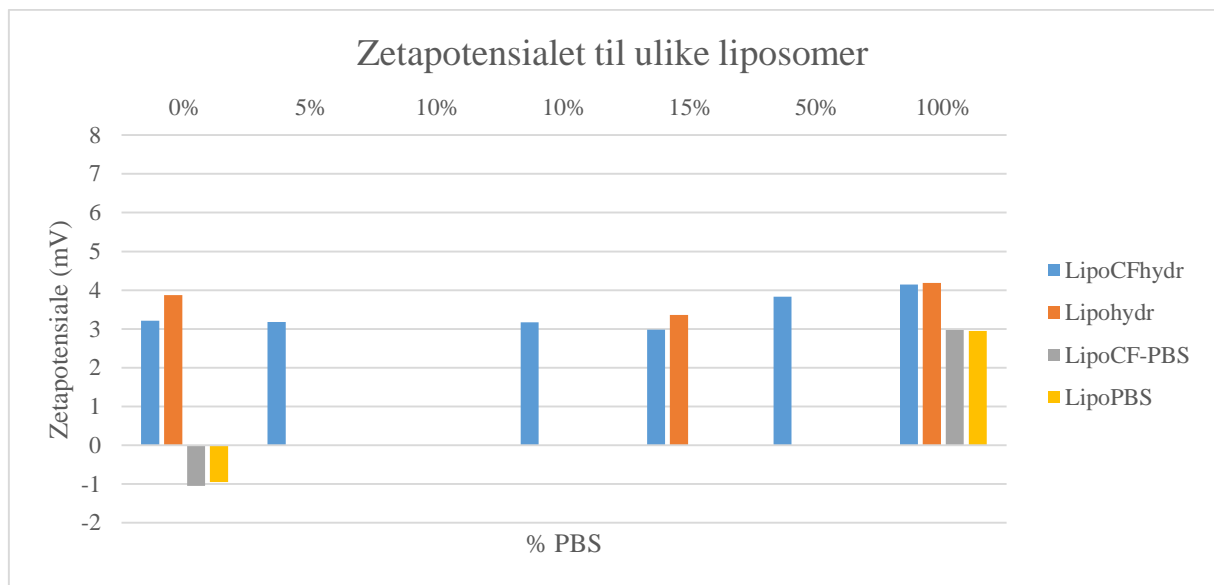
*Zetasizer

Batch 1 ble det målt størrelse av etter gelfiltrering, mens resten ble det målt dagen etter ekstrudering. Batch 1 ble det også foretatt størrelsesmåling tre dager etter ekstrudering og størrelsen ble 243,2nm.

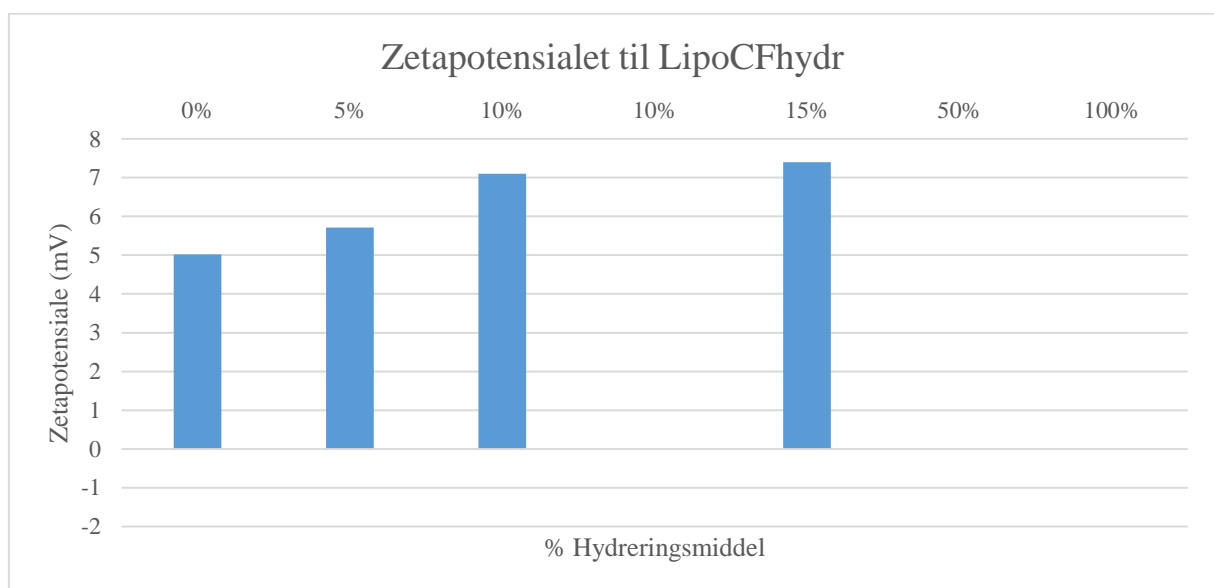
6.2.2 Zetapotensiale

Det ble produsert liposomer som beskrevet i kapittel 5.2.1 og resultatet fra målingene er presentert i figur 13.

Det ble i første omgang forsøkt å måle zetapotensialet til 1 ml hydreringsmiddel og 10 μ l Lipohydr som gav et gjennomsnitt på 58,6 mV, men en høy konduktivitet på rundt 39 mS/cm. Dette er grunnen til at det ble forsøkt å gradvis øke hydreringsmiddel som beskrevet i kapittel 5.2.4.

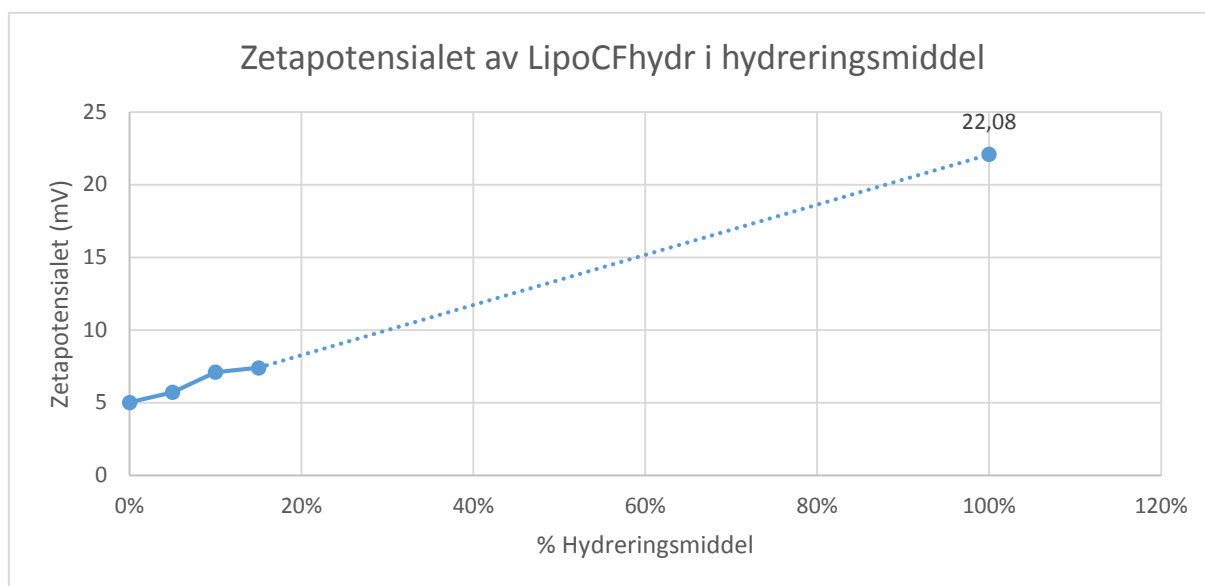


Figur 13: Zetapotensialet oppgitt som et gjennomsnitt av $n=5$ for de ulike liposomene der X-aksen er mengde PBS angitt i % og Y-aksen er zetapotensialet angitt i mV.



Figur 14: Zetapotensial (gjennomsnittet av 5 målinger) endringer ved økt prosentandel hydreringsmiddel. X-aksen angir mengde hydreringsmiddel i % og Y-aksen angir zetapotensialet i mV.

Det viser seg zetapotensialet øker med økt mengde hydreringsmiddel. Dersom denne trenden fortsett lineært vil 100% hydreringsmiddel tilsatt LipoCFhydr være 22,08 (mV) som vist i figur 15.



Figur 15: Viser zetapotenisalet ved 100% hydreringsmiddel dersom trenden er linear.

Konduktiviteten var målt til være rundt 5-6 mS/cm, og max 10 mS/cm noe som er akseptablet og gir pålitelige resultater.

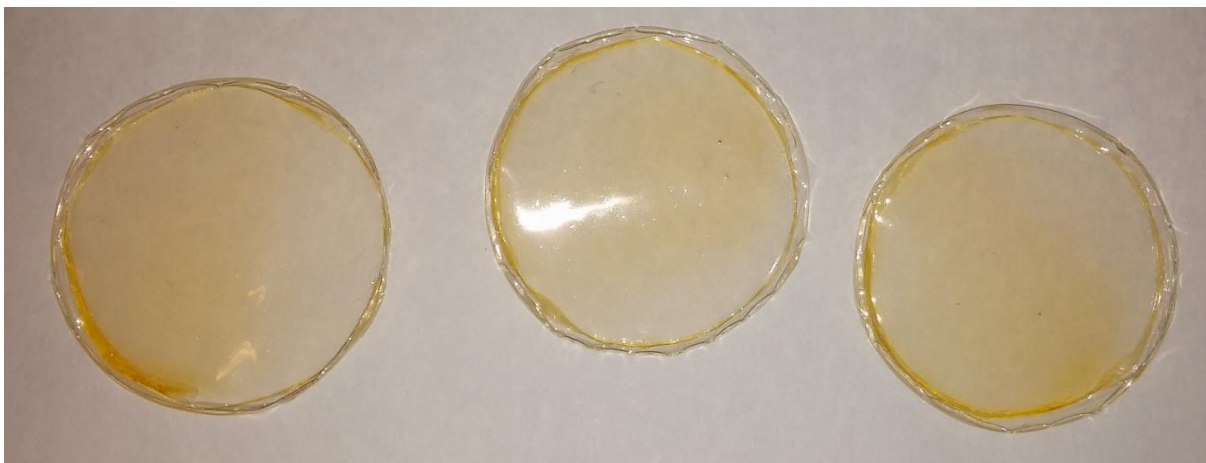
Resultatene viser at soya-PC liposomene i hydreringsmidlet og i PBS utviser svak positiv ladning. PBS påvirker ikke konduktiviteten i stor grad, mens hydreringsmidlet forårsaker høy konduktivitet. Det viser i tillegg at PBS gjør at disse liposomene blir positivt ladet, noe som er viktig å vite i forhold til interaksjoner som dannes med filmene. Samtidig bekreftes det at Soya-PC i MilliQ H₂O er negativt ladet som er i samsvar med foregående arbeid der samme fremstillingsmetode har blitt benyttet.

6.3 Filmfremstilling og frisettingsforsøk for HCl-filmer

6.3.1 Filmfremstilling av HCl-film med LipoCF-PBS

Det ble innledningsvis funnet ut at filmene tørket fortest dersom det ikke var lokk på petriskålene og at de tørket best på trinn 2 i granulatskapet.

Filmene ble produsert etter beskrivelse i kapittel 5.3.1 og resultatet var at filmene ble gjennomsiktige, men blakket som vist i figur 16, sammenliknet med filmene som ble fremstilt på Storfjell-Olvens måte vist i figur 17 [4]. Lupe (Leica MZ 16, Leica Microsystems, Tyskland) ble også benyttet til å se om det var utkrystallisering/utfellinger, noe det ikke var.



Figur 16: Filmer etter endt tørke- og eksikatorprosess i 0,1 M HCl med tilsetning av LipoCF-PBS.



Figur 17: Film fremstilt i 0,1 M HCl uten liposom tilsetning

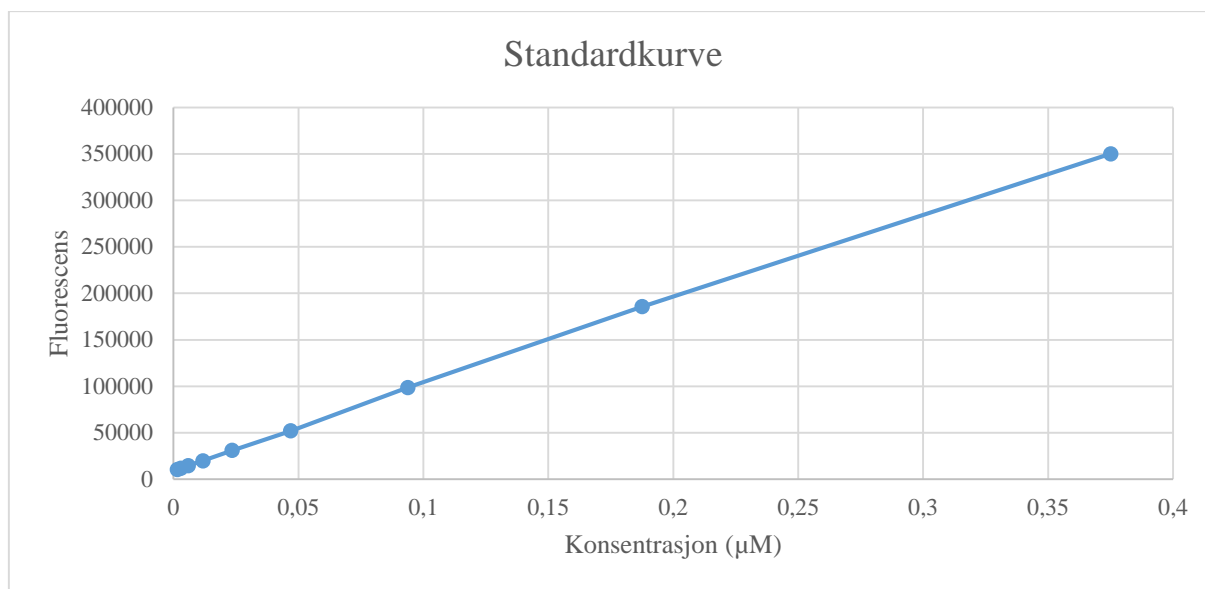
6.3.2 Frisetting med gjennomstrømningscelle og fluorescensmåling

Bruk av gjennomstrømningscelle til frisettingsstudier gav svært kontrollerbare betingelser. Hastigheten var vanskelig å stille inn på eksakt 8 ml/min på hvert slange-sett, derfor ble det besluttet å godta 5% avvik. Ingen av gangene var avviket større enn dette. Avlest temperatur før og etter start i varmtvannet avvike høyest 2% fra innstillingen på 37 °C. Visuelt ble det observert at alle filmene fikk frisettingsmediet samtidig, og at pumpemekanismen gikk stort sett. Ulempen var at slangene er svært følsomme, slik at det ikke skal mye til før de forstoppes og væsken ikke blir pumpes igjennom. Til tross for dette gav instrumentet reproducerbare resultater (vedlegg 5), men en svakhet var at det enkelte ganger viste høyere verdier enn forgående, mulig dette skyldes oppheting av instrumentet ved langtidsbruk. De høye verdiene kan også skyldes utpipetterings feil, luftbobler og liknende. Instrumentet er svært følsomt for

luftbobler. I tillegg er noen verdier mye lavere enn resten av målingene, noe som kan være forårsaket av feil i rutinen og/eller arbeidsbetingelsene blant annet arbeid i mørket.

Standardkurve for HCl filmer med og uten liposomer

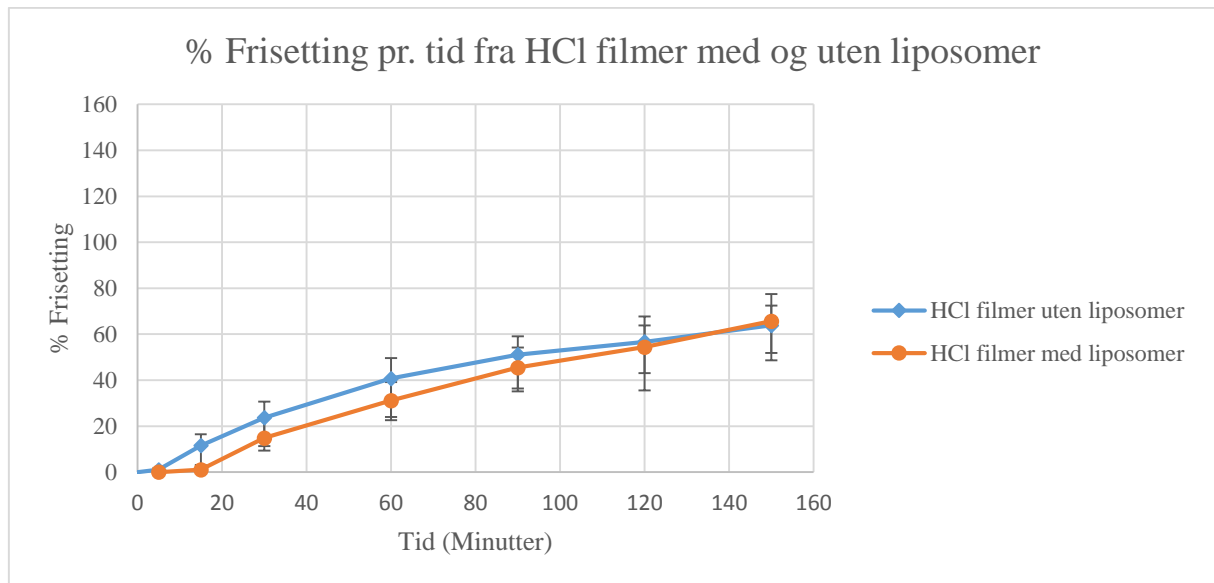
Standardkurven ble målt som beskrevet i kapittel 5.3.3.2, og resultatene er gjengitt som et gjennomsnitt av alle målingene i figur 18.



Figur 18: Standardkurve av CF som viser lineære sammenhengen mellom fluorescens og mengde i µM av CF. Gjennomsnittet av n= 3 målinger for hver konsentrasjon er vist, samt et gjennomsnitt av alle målingene som ble foretatt t hver gang en prøve ble målt.

Frisetting av CF fra HCl filmer med og uten liposomer

HCl filmer med og uten liposomer ble produsert som beskrevet i kapittel 5.2.1. Som vist i figur 19 ble det observert relativt jevn frisetting fra både filmer med og uten liposomer. Det ble konkludert med at HCl filmer gav raskere frisetting enn forventet utfra en tidligere rapportert lekkasje-studie, der lekkasjen strakt seg over uker/måneder [86]. Frisettingen for de enkelte filmene kan ses i vedlegg 6.



Figur 19: Frisettingsprofilen av CF fra HCl filmer med og uten liposomer til PBS. Gjennomsnittet av $n = 3$ målinger for hver type film vises, standardavviket vises som feilfelt.

6.4 Metodeutvikling

6.4.1 Filmer ved høyere pH med ulike buffersystem og ladningsskjerming











Hovedproblemet var fase-separasjon, og dette fremkom svært tydelig ved visuell inspeksjon uten behov for ytterligere instrumentelle analyser. I denne delen vil derfor resultatene bli illustrert i form av bilder, og pH vil også bli oppgitt. I pH-en delen står forkortelsen P for pektinløsningens pH, K for kitosanløsningens pH og S står for pH løsningen etter sammenblanding.

Ulikebuffersystem

Fosfatbuffer



Kapittel 5.4.1 beskriver fremgangsmåten og tabell 17 viser resultatene. En visuell vurdering ble foretatt av filmene. Ingen av filmene ble blanke, kun filmen laget i fosfatbuffer med høy ionestyrke (pH 3,4) viste seg å være noe blankere enn de andre. Det var en tydelig gul farget fase-separasjon i alle filmene, noe som tydet på at kitosan ikke var løst.

Tabell 17: Kombinasjonsfilmer med ulike fosfatbuffer er vist, der det øverste tallet i første kolonne representerer pH i bufferen, andre kolonne viser polymerløsningen rett etter støping og tredje viser filmene etter endt tørkeprosess.

pH	Rett etter støping	Etter tørking
2 P:2,1 K:2,9 S:2,6		
3 P:2,94 K:6,3 S:6,1		
3,4 P:3,2 K:6,0 S:5,8		
7 P:6,7 K:7,1 S:6,8		
8 P:8,0 K:7,4 S:7,6		

Vinsyrebuffer

Produksjonen foregikk som beskrevet i kapittel 5.4.1 og resultater er vist i tabell 18. Det var observert en synlig gel-klump ved pH før, og fase-separasjon etter som også filmer i pH 4 utviser.











pH	Rett etter støping	Etter tørking
3 P:3,0 K:6,1 S:5,6		
4 P:3,6 K:6,6 S:6,3		

Tabell 18: Kombinasjonsfilmer med ulike vinsyrebuffer er vist, der det øverste tallet i første kolonne representerer pH i bufferen, andre kolonne viser polymerløsningen rett etter støping og tredje viser filmene etter endt tørkeprosess.

Ladningsskjerming

Filmene under er utarbeidet som beskrevet i kapittel 5.4.2 og i figur 19 viser at det ikke noe umiddelbar forbedring med ladningsskjerming. I tillegg viste det seg at det ikke var stor forskjell på de nye og gamle batchene av pektin og kitosan.







Tabell 19: Forbedring av kombinasjonsfilmene med ammoniumacetat, ladningsskjerming. Ulike formuleringer er beskrevet kort i kolonne en. Andre kolonne og tredje viser hhv polymerløsningen rett etter støping og filmene etter endt tørkeprosess.

Type	Rett etter støping	Etter tørking
(1a) Vinsyrebuffer pH 3 med 5 M ammonium-acetat P:5,4 K:6,5 S:-		
(1a) Vinsyrebuffer pH 3 med 5 M ammonium-acetat (ny batch med pektin og kitosan) P:5,3 K:6,6 S:5,9		
P:5,3 K:6,5 S:5,6		
(1a) Vinsyrebuffer pH 4 med 5 M ammonium-acetat P:5,8 K:7,0 S:6,8 (ny batch pectin)		
(1b) Destillert vann med 5M ammonium-acetat P:5,8 K:7,1 S:6,8		

Redusert mengde ammoniumacetat

Etter beskrivelsen i kapittel 5.4.2 er alle filmene under produsert likt men unntak av siste der urea er tilsatt. I tillegg var det benyttet ny batch med kitosan i film I og II, men en gammel batch i film III.

Tabell 20: Filmer med redusert mengde 5 M ammoniumacetat er vist, der film I og II har samme blandingsforhold, og film III er tilsatt urea. Andre og tredje kolonne viser hhv polymerløsningen rett etter støping og filmene etter endt tørkeprosess.

pH	Rett etter støping	Etter tørking
(1c) I P:5,4 K:6,5 S:6,0		
II P:5,4 K:6,5 S:6,3		
(1c) III P:5,4 K:6,5 S: -		

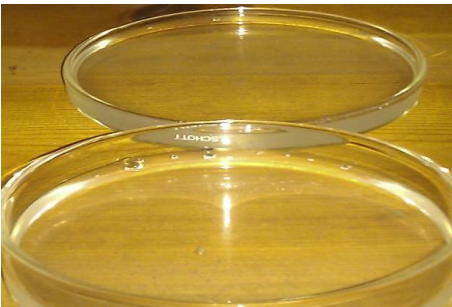

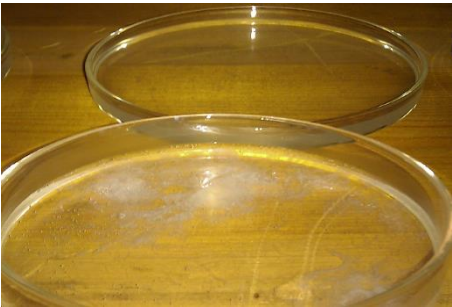


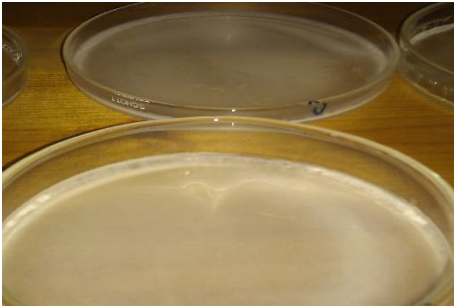


Filmene utviser en viss bedring/klarhet i utseende med unntak av gel-klumpene, aggregater, som dannes. Film III ble hvit, noe som kan fastsettes skyldes urea.

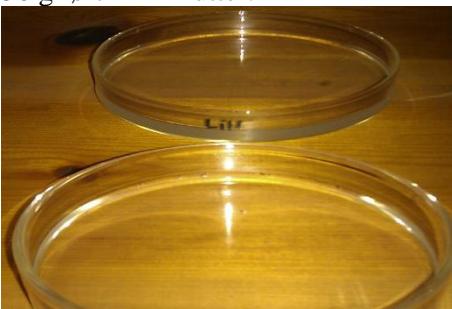



Ulike medier

Ulike medier å løse pektin og kitosan ble forsøkt som beskrevet i kapittel 5.4.2 og siden det viste seg at det ble dannet aggregat ble det forsøkt med ulike metoder å fjerne disse. Resultatet

i figur 21 viser at det blir dannet visuelt meget fine filmer ved tilsetning av mer ammoniumacetat og urea. Dette ligger til grunn for screening faktorforsøket som beskrives senere i teksten, i tillegg til røretiden som vist i de to siste filmene.

Tabell 21: Første kolonne viser pH-en, andre kolonne viser polymerløsningen rett etter støping der de ulike intervensjonene er beskrevet og tredje kolonne viser filmene etter endt tørkeprosess.

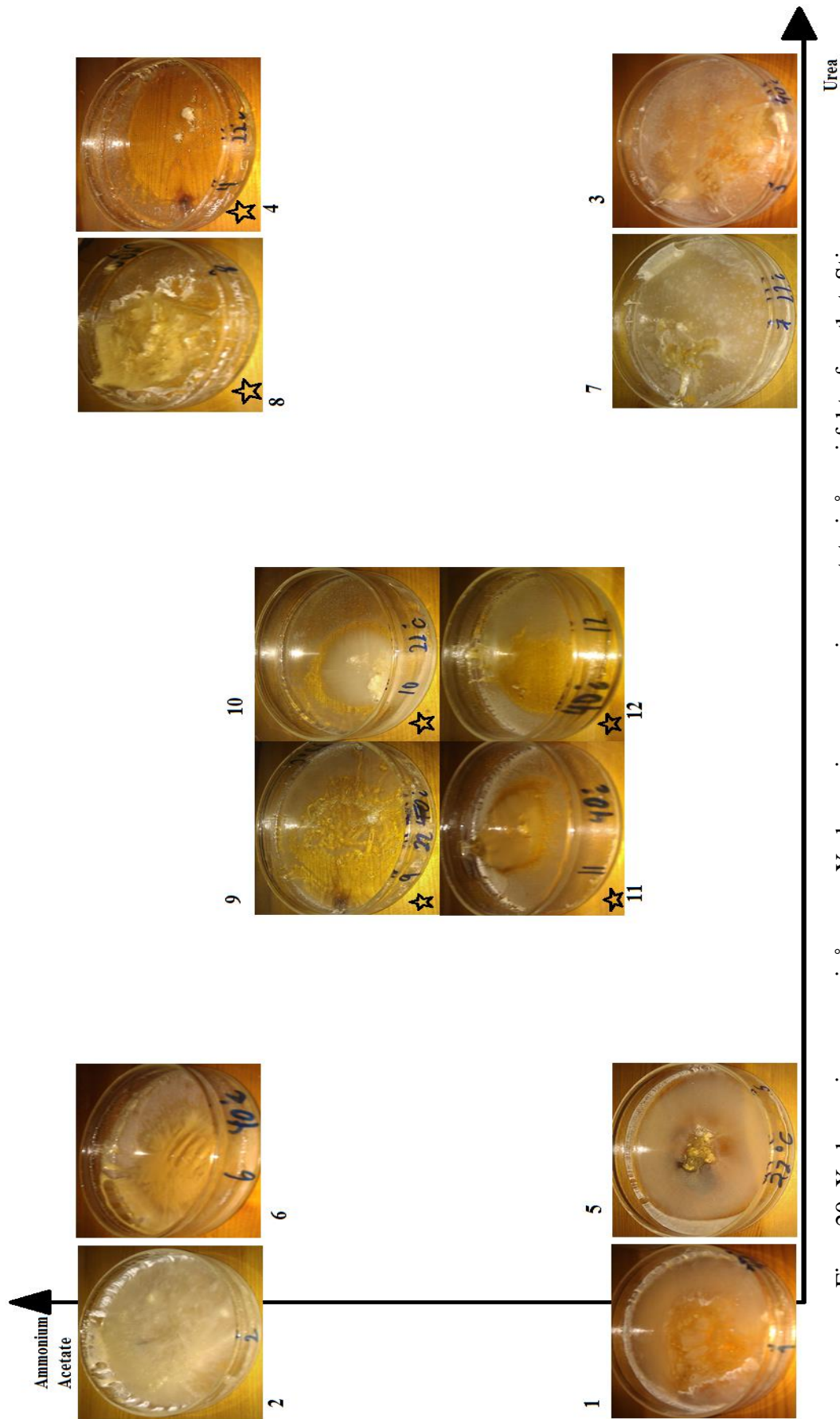
pH	Rett etter støping	Etter tørking
(1 d) P:3,0 K:1,2 S:5,6	Mer ammoniumacetat: 	
	Varme: 	
	Urea: 	
	Stavmikser: 	

pH	Rett etter støping	Etter tørking
P:7,0 K:1,1 S:5,9	Kitosan i HCl og pektin i 5M amm 50 g rørt i 2 minutter:  50 g rørt i 30 minutter: 	 

6.4.2 Optimalisering av kombinasjonsfilmer

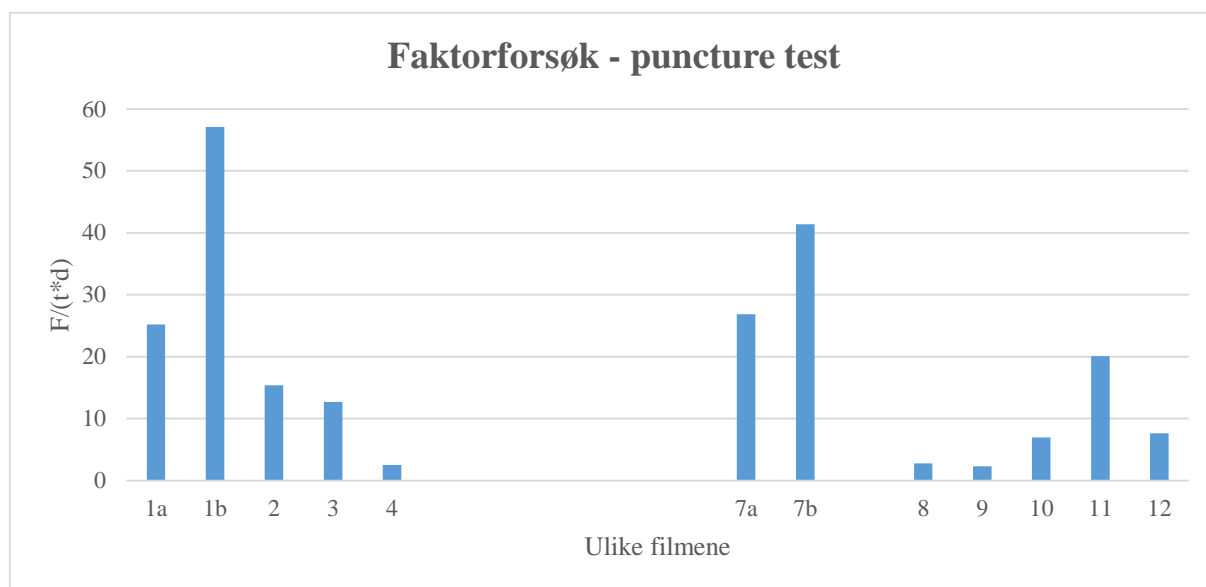
Faktorforsøk – screening

I foregående resultater tydet det på at ammoniumacetat, urea, rørelengde og varme var av betydning for å oppnå visuelt god kvalitet på filmene. Det ble besluttet å gjennomføre et redusert faktorforsøk som skulle undersøke/screene raskt hvilke faktorer som var av betydning, og disse resultatene er vist i figur 20.



Figur 20: X-aksen viser urea nivåene og Y-aksen viser ammonium acetat nivåene i faktorforsøket. Stjerne indikerer ikke tørre filmer og tallene representerer utseende scor.

Den mekaniske responsen (puncture styrken) ble valgt og beregnet med formelen $F/(t \cdot d)$ der F er maks kraft (N), t er tykkelsen på filmen (mm) og d er diameteren på hullet (1,4 cm) [87]. Resultatet for den mekaniske styrken disse filmene hadde er vist i figur 21. Film 1b var tykkere enn 1a, og filmene 4,8,9,10,11,12 var ikke helt tørre, noe som kan ha innvirkning på resultatene.



Figur 21: Puncture- test for ulike formuleringene som ble testet i screening-faktorforsøket. Bokstaver viser at det fra samme film ble kjørt to paralleller. Film nr 5 ble det ikke noe hull i og film nr 6 var for sprø til å analyseres.

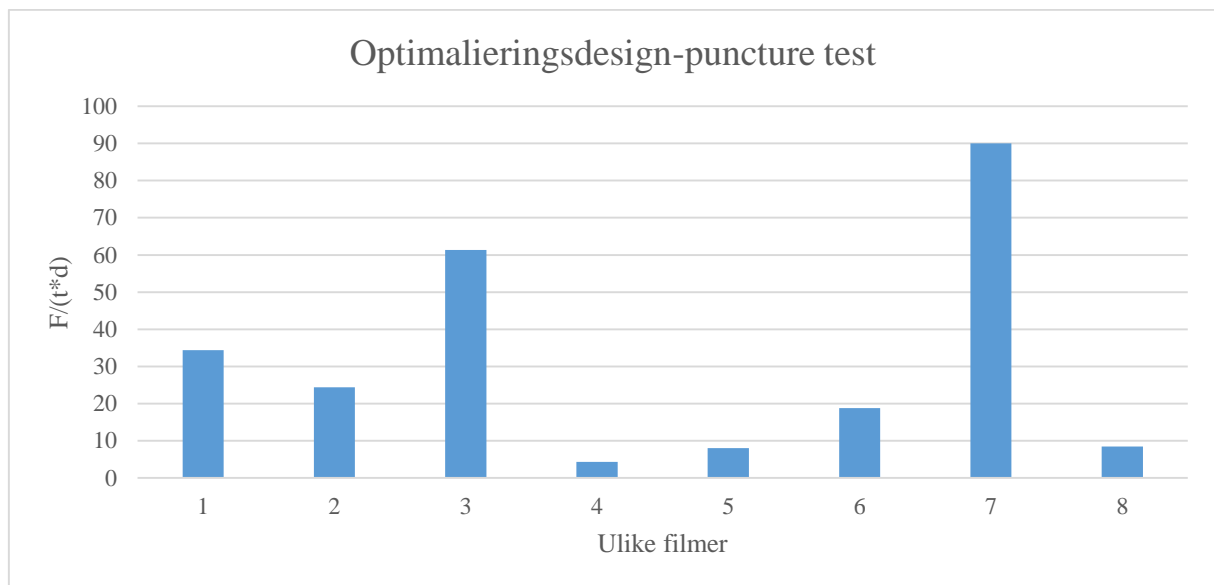
Resultatene fra screening forsøket er oppsummert i tabell 22 der utseende/klarhet av kombinasjonsfilmene har blitt rangert fra 1 til 12. Samme rangering har blitt utført på mekanisk styrke. Som tidligere beskrevet var ikke alle filmer tørre, men selv etter lenger tørketid så disse best ut. I forsøket varierte pH-en fra 5,1 til 6,3. Resultatet tyder på at filmen som fikk utseende 1 (best) hadde nesten den dårligste mekaniske styrken, og film med utseende 2 fikk dårligste mekaniske styrken. Tyder på at de med dårligst utseende har hatt sterke mekanisk styrke. Det kan skyldes at i fleste av disse var det aggregater/gelklumper.

Tabell 22: Visuell vurdering av utseende til kombinasjonsfilmene og mekanisk styrke rangert fra 1 til 12, der 1 er beste score og 12 dårligst. pH etter sammenblanding er oppgitt i kolonne tre fra venstre.

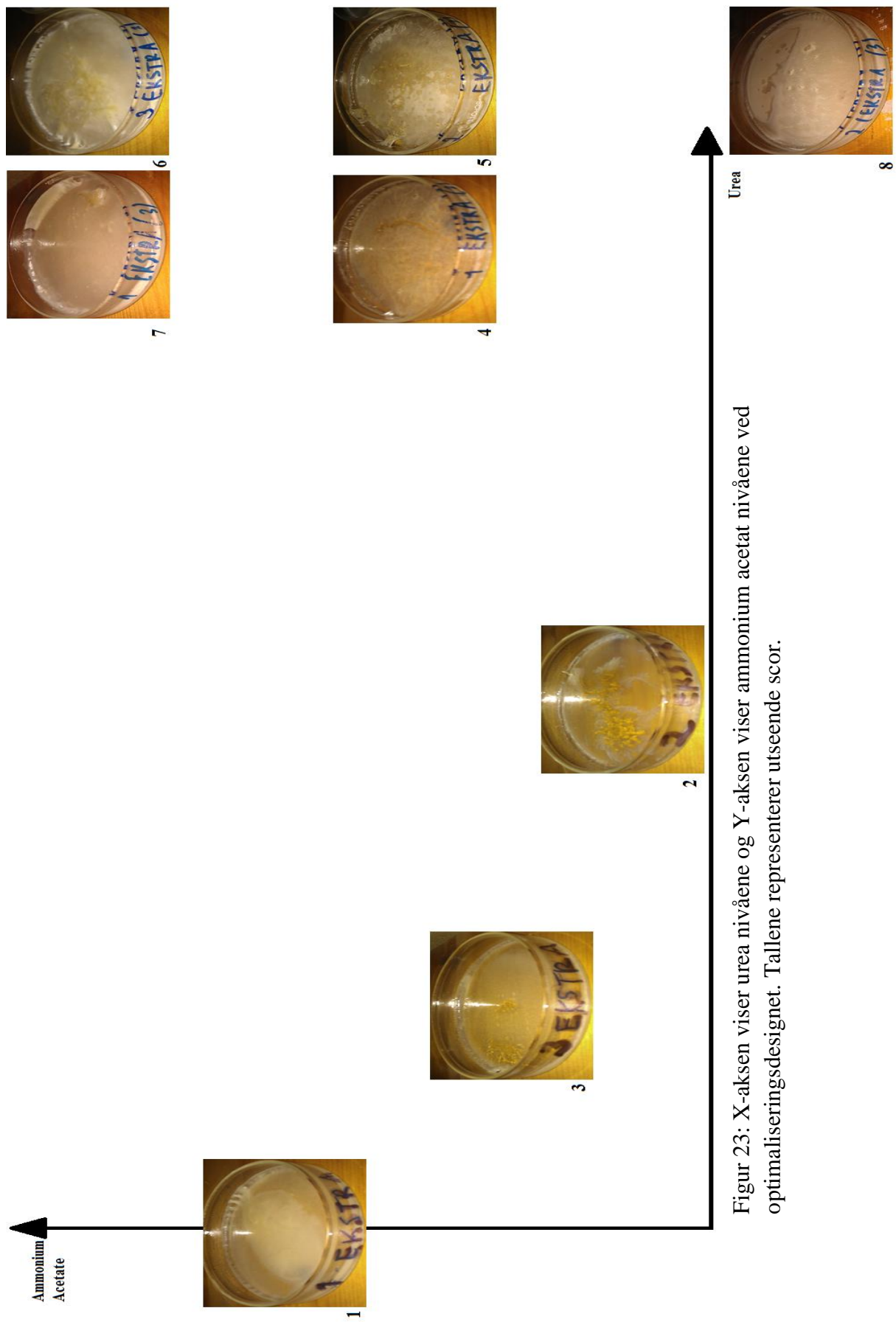
Film	Utseende	pH etter sammenblanding	Mekanisk styrke på filmene
1.	9	5,1	1
2.	6	6,3	4
3.	11	5,2	5
4.	1	6,1	9
5.	8	5,1	-
6.	12	6,0	-
7.	7	5,1	2
8.	10	6,1	8
9.	2	5,8	10
10.	4	5,8	7
11.	5	5,8	3
12.	3	5,9	6

Optimaliseringsdesign

Det ble konstatert ved hjelp av programvaren Modde 9.1, Umetrics AB at kun ammoniumacetat og urea var betydelig for å få gode kombinasjonsfilmer. Derfor ble disse faktorene undersøkt ytterligere, og resultatene foreligger i figur 22 og 23. Resultatet viser forholdsvis ganske gode filmer og at filmer med det beste utseende/klarhet hadde de høyest mekanisk styrke.



Figur 22: Puncture- test for ulike formuleringene som ble testet i optimaliseringsdesignforsøket.








Figur 23: X-aksen viser urea nivåene og Y-aksen viser ammonium acetat nivåene ved optimaliseringsdesignet. Tallene representerer utseende scor.

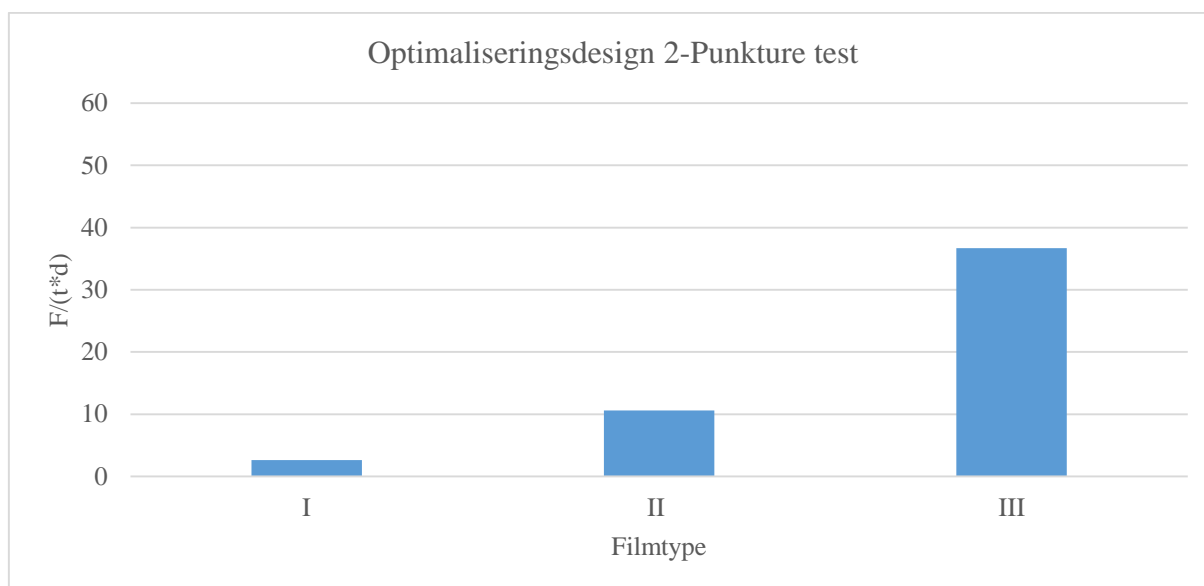
Tilleggs forsøk for å få optimal kombinasjonsfilm

Det ble forsøkt med en optimal oppskrift etter foregående resultater, og til denne ble Lipohydr tilsatt og resultatet er gitt i tabell 23. Resultatet av kontrollert tilsetning av kitosan- til pektinløsningen er også vist i tabellen. Kontrollert tilsetning viser seg å være helt avgjørende for å få gode filmer. Kombinasjonsfilmer med liposomer der kitosanløsningen ble tilsatt kontrollert viste seg å være av bra kvalitet, men noe blakket.

Tabell 23: I er kombinasjonsfilm med liposomer, II er kombinasjonsfilm uten liposomer og III viser filmer med kontrollert tilsetning av kitosanløsning til pektin. IV og V er helt like I og II bare at tilsetningen er utført kontrollert.

pH	I	II
I P:6,1 K:1,1 S:5,1		
II P:6,2 K:1,1 S:4,9		
IV P:6,5 K:1,9 S:5,8		
V P:6,5 K:1,9 S:5,7		

Figuren 24 viser tydelig at den mekaniske styrken til filmer med kontrollert tilsetning av kitosan- til pektinløsningen er vesentlig høyere enn for den andre. Dette er noe som utseendemessig bekreftes ved at filmene er jevn og ikke tynne.



Figur 24: Puncture test for filmtyp I er med liposomer, II er uten liposomer og III er med liposomer og kontrollert tilsetning, n= 3 filmer.

Stort sett alle filmene har blitt sett på under lupe (Leica MZ 16, Leica Microsystems, Tyskland). Resultatene viste tydelig fase-separasjon og linjer ved gel-klumper, noe som bekrefter samme resultater som er fotografert. Imidlertid var de blanke filmene fremstilt ved kontrollert tilsetning helt gjennomsiktige, uten utfelling.

6.5 Frisetting av CF fra filmer med liposomer og uten liposomer

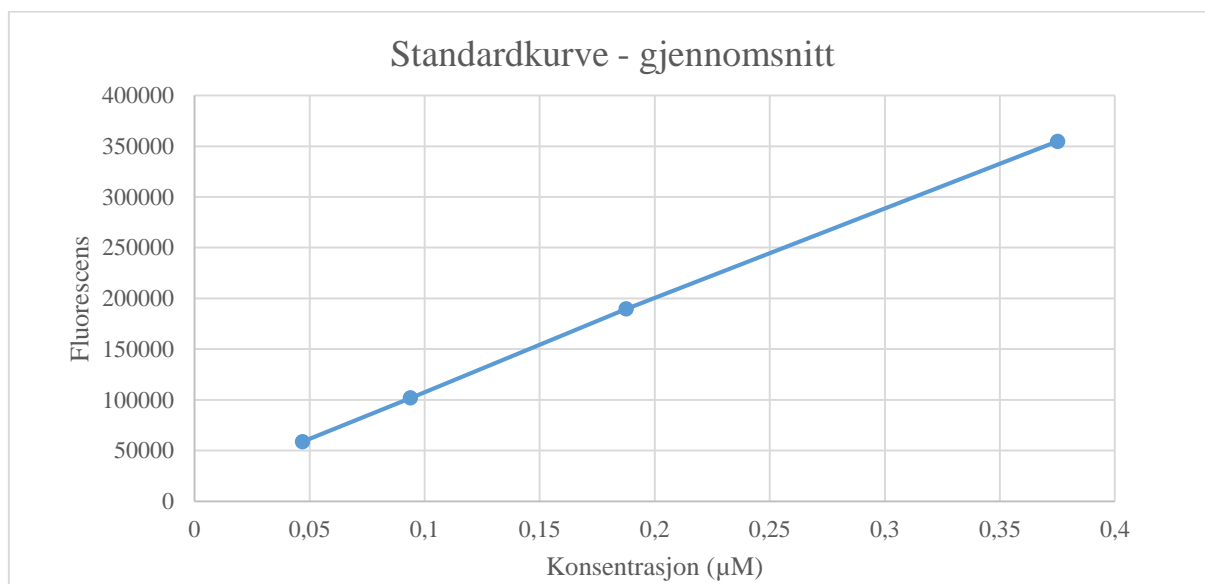
6.5.1 Filmer med liposomer med CF, filmer med bare CF og liposomer med CF.

Det har hele tiden vært tre replikater for hver film batch, imidlertid har ikke alle blitt tatt med i gjennomsnittsberegningene siden det kan gi ukorrekt inntrykk. Årsaken til fjernet replikater var at pumpen sviktet ved start av forsøkene. Dette ble observert ved at det ikke kom noe tilbake til frisettingsmediet fra gjennomstrømningscellen. Hver ny batch med filmer og hver kjøring ble det kjørt standardkurver.

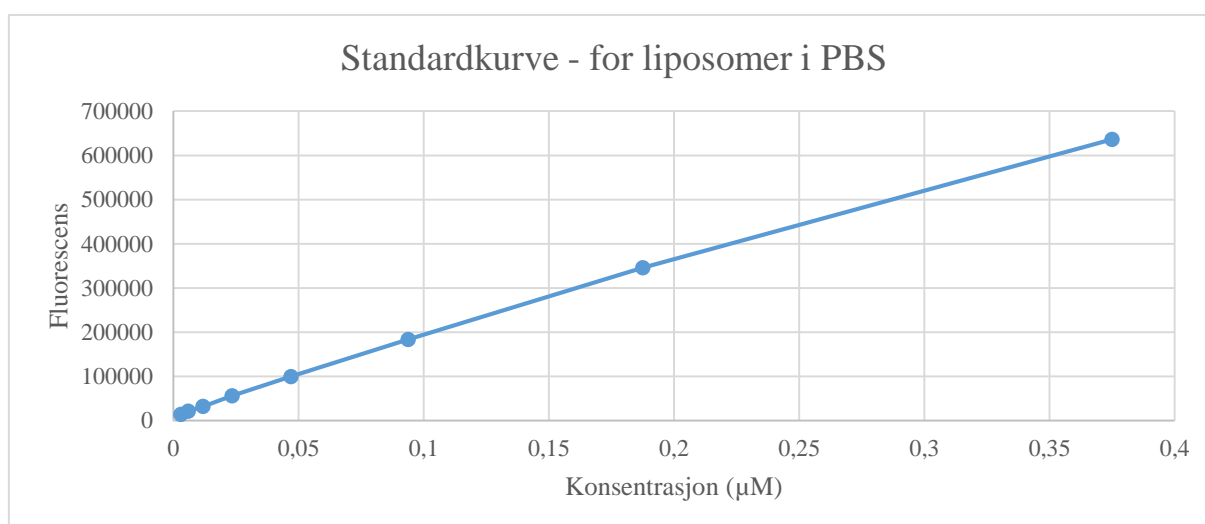
Standardkurve resultatene viste seg å være meget reproducerbare, liten variasjon mellom kurvene, og av den grunn ble det besluttet å lage en gjennomsnitts-standardkurve vist i figur 25 som ble brukt å bestemme frisettingsmengden for alle kombinasjonsfilm kjøringene. Ettersom det totalt gjennom disse frisettingskjøringene ble laget tre 1,5mM CF stamløsninger bekrefter dette at fortynningsrekkene også var reproducerbare. Vedlegg 5 viser utfyllende

resultater for de enkeltmålingene. På grunn av manglende standardkurve linearitet over målområdet ble konsentrasjonsberegningen utført ved interpolering innen det relevante intervallet.

Det ble laget egen standardkurve vist i figur 26 for måling av CF fra liposomer siden dette forsøket ble utført annerledes.

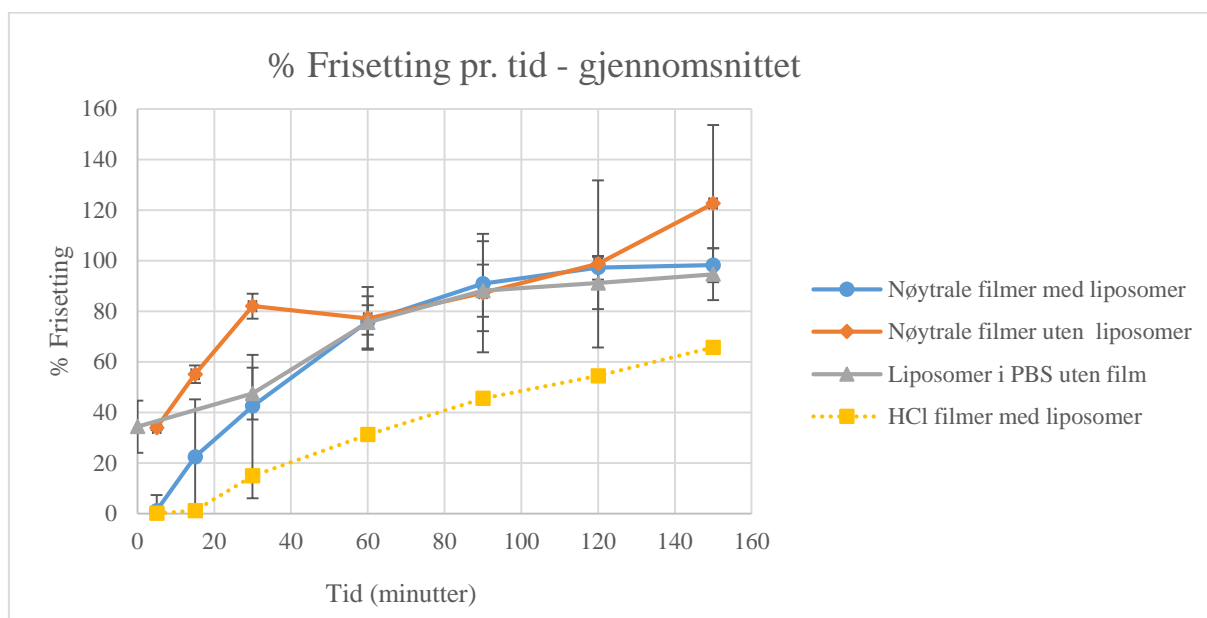


Figur 25: Gjennomsittsstandardkurve av CF som viser lineær sammenheng (r^2 0,999) mellom fluorescens og mengde i µM av CF.



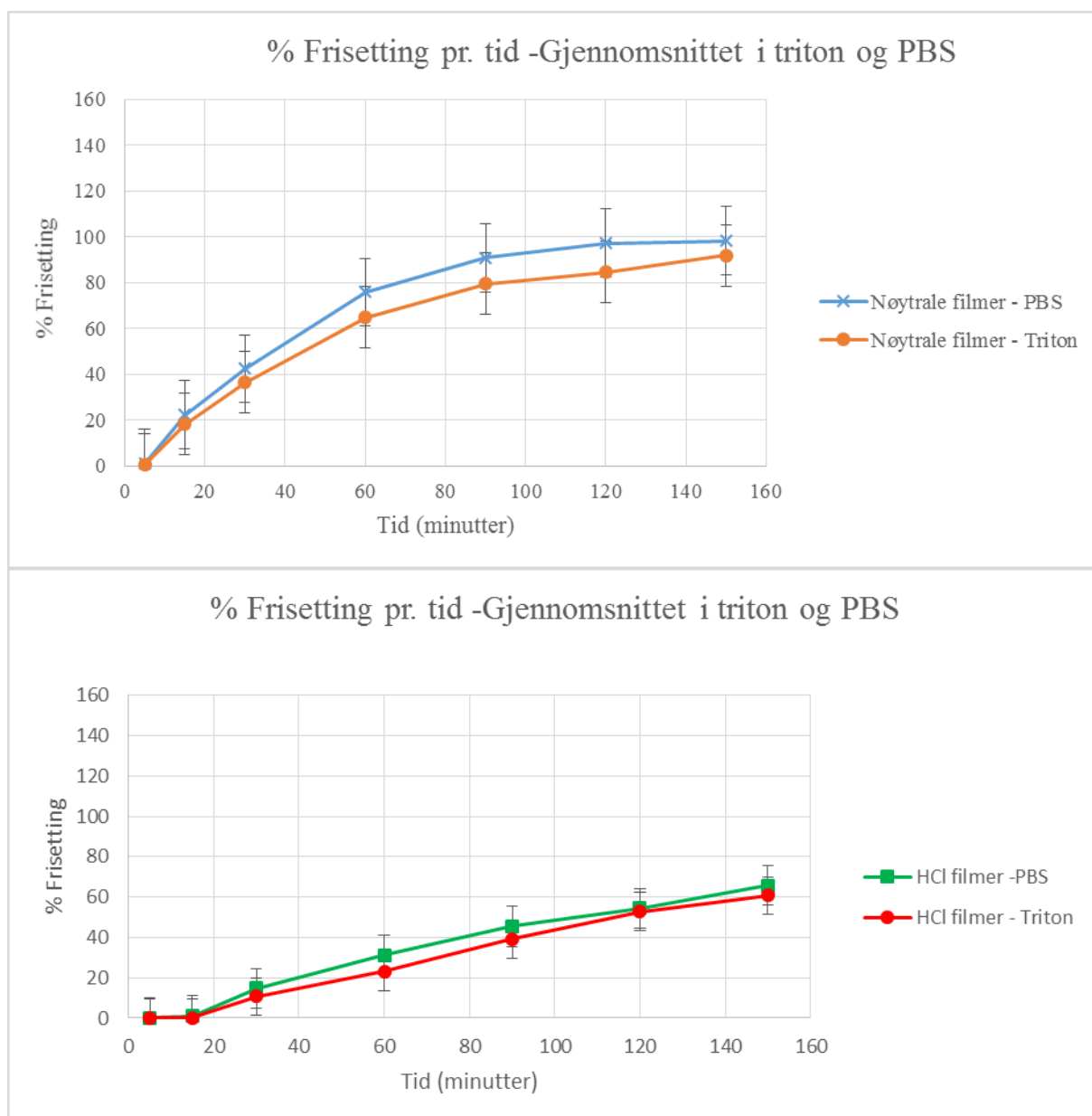
Figur 26: Standardkurve av CF som viser lineær sammenheng (r^2 0,998) mellom fluorescens og mengde i µM av CF.

Figur 27 viser et gjennomsnitt av alle kjøringene som ble utført, enkelt kurvene er vist i vedlegg 7. Det ble besluttet å bruke gjennomsnittskurven til filmer med CF med minst innkapslet CF til tross for at kurvene med mer CF viste jevnere kurver. Felles plott på dette er vist i vedlegg 7.



Figur 27: Gjennomsnitts frisettingsprofilene for filmer ved høy pH med liposomer, filmer ved høy pH uten liposomer, liposomer i PBS uten filmer og HCl filmer med liposomer. Feilfeltet viser gjennomsnitts standardavviket til målingene.

Filmer med liposomer ble det kjørt paralleller med tilsetning av triton til prøvene og ikke, resultatene foreligger i figur 28. Det viser at det ikke ble observert signifikant forskjell mellom prøver tilsatt og ikke tilsatt triton. Med dette ble det konkludert at det ikke var nødvendig å sette fokus på dette, og at det mest sannsynlig tydet på at liposomene ikke kom ut av kombinasjonsfilm-nettverket.



Figur 28: Gjennomsnitts frisettingsprofiler for filmer med liposomer der prøvene er enten tilsatt PBS eller triton. Feilfeltet viser gjennomsnitts standardavviket til målingene.

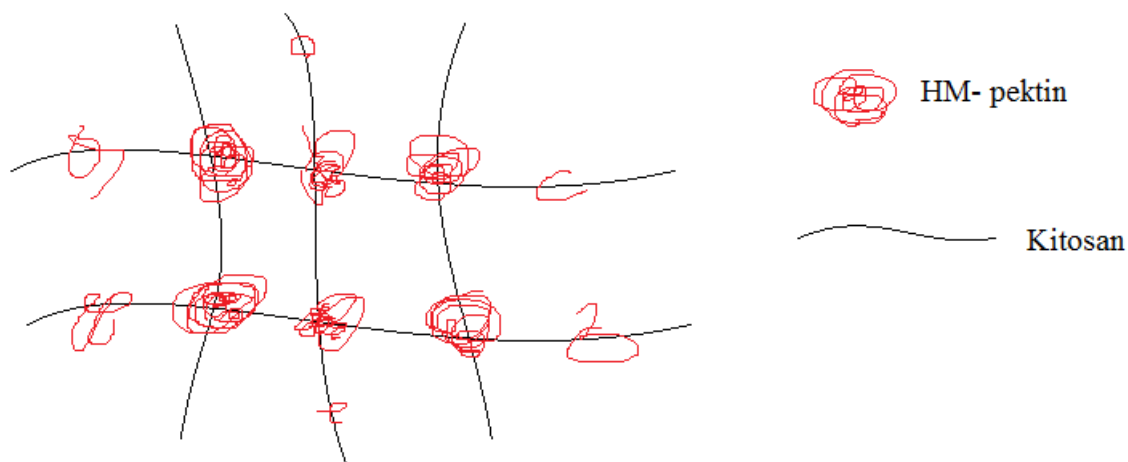
6.5.2 Reløsning av filmene

Det ble forsøkt å reløse filmene som beskrevet i kapittel 5.5.3 for å finne hvor mye CF som satt igjen etter endt frisettingsforsøk. Nettverket var intakt med alle metodene som ble forsøkt. Det ble kun observert at filmene ble blankere. Det ble konstatert at med undersøkte metodene var det ikke mulig å løse filmene [88].

7. Diskusjonen

7.1 HCl-og nøytrale filmdannelse

Det har tidligere blitt bevist at pektin alene ikke danner gode nok filmer til å kunne benyttes i frisettingsformuleringer, på grunn av at pektin har hydrofile egenskaper og oppløses i vandig miljø [89]. Filmer av kun kitosan i HCl har en tendens til å krystalliseres (hvit) og krympe, spesielt kitosan med lav deacetyleringsgrad [57]. Sammenhengen er at kitosan med lav deacetyleringsgrad har færre amin-grupper som kan protoneres og frastøte hverandre. Dette vil resultere i et mindre utstrakt molekyl, sammenkrymping. Pektin strukturen med den hårete delen og glatte delen –ryggraden, samt intramolekylære H-bindinger vil kunne forhindre krystallisering [32, 57]. Derfor er kombinasjonen av disse to polymerene gunstig. Resultatene (figur 19), og tidligere studier viser at kitosan-pektin kombinasjonsfilmer ved lav pH er klare/gjennomsiktige, jevnt fordelt, stabile og av god kvalitet [4, 57, 71]. Ved lav pH vil pektin være uladet, mens kitosan vil være ladet i løsemidlet og dermed i utstrakt form på grunn av frastøtningen mellom ladningene. I følge tidligere litteratur [85, 88] vil nettverket holdes av H-bindinger som dannes mellom pektin og kitosan før filmstøping. Frie -COOH og NH_2 grupper på hhv pektin og kitosan vil kunne danne H-binding med -OH og -COOCH_3 grupper på hver andres struktur [90]. I og med HM-pektin(-COOH) ikke er ladet ved denne pH-en vil trolig denne polymeren bidra mest til disse H-bindingene. Det antas at det dannes et nettverk som vist i figur 29 der HM-pektin vil krølle seg sammen og danne hydrofobe interaksjoner, samt H-bindinger med seg selv [88].



Figur 29: Nettverket som dannes når pektin og kitosan løses i 0,1M HCl.

Ved tørking vil den vandige delen av løsningen fordampe og løsningen vil ikke lenger være fortynnet. Når overlapskonsentrasjonen overskrides tvinges disse polymerne til å danne binding, samt med seg selv [31]. I følge Storfjell-Oven vil dette nettverket (figuren 29) også være likt etter tørkeprosessen siden ordningen i flytende fase var slik at pektin-knutene vil assosieres med kitosan, og prøve å nøytralisere de positive ladningene på kitosan. Neste kitosankjede vil legge seg i dette området siden frastøtingen vil være minst her [4].

Nettverks dannelse av nøytrale filmer vil derimot forklares på en annen måte enn HCl, siden pH-en var vesentlig høyere, cirka 6, ved sammenblanding av disse polymerne.

Fremgangsmåten for nøytrale filmer vil bli diskutert senere i oppgaven. Urea ble tilsatt for å blokke H-bindinger [82] og ammoniumacetat for å skjerme ladningene som oppstår på begge polymerene ved denne pH-en [79]. På denne måten ble en spontan dannelse av vann uløselig gel-liknende utfelling forhindret [79]. I motsetning til HCl-filmer der det er mulighet for H-bindingers dannelse, vil det ikke kunne dannes noen assosiasjon mellom polymerene i denne blandingen. Dette kan forklares med at både ione -og hydrogen bindinger er blokkert. Det antas at polymerkjedene er tilfeldig orientering som vist i figur 30.

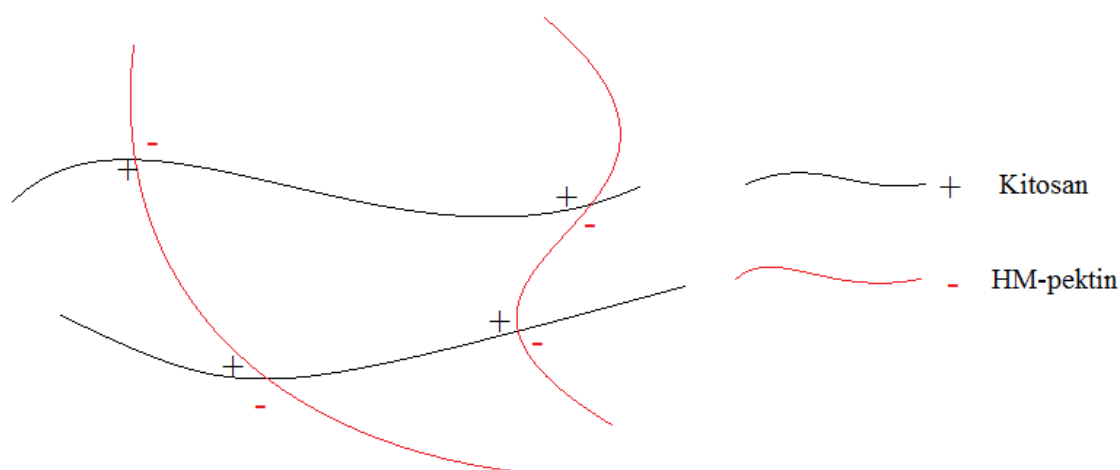


Figur 30: Orientering av polymerkjedene ved nøytral pH når H-bindinger og ionerbindinger er blokkert.

Langsom tilsetning av kitosanløsning til pektin gav bedre resultatet enn da det ble tilsatt raskt, noe som kan muligens forklares med at polymerene får tid til å organisere seg bedre. I følge Jindal M ville ammoniumacetat, samt løsemidlene fordampe gradvis, slik at det ikke forekommer noen gel-dannelse under tørkeprosessen [79]. Urea er derimot ikke flyktig og ble visuelt synlig i filmene.

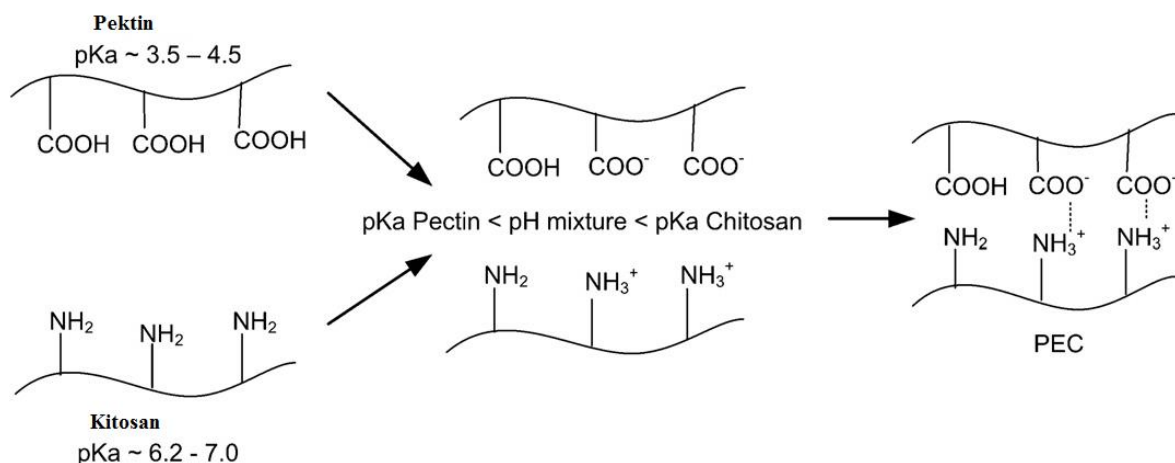
7.2 HCl- og nøytrale filmer- rehydrering

De nøytrale filmene ble rehydrert under frisettingsforsøk, og det antas at det ble dannet ione-interaksjoner mellom ladningene, illustrert med figur 31. I tillegg antas at disse er mindre ordnet enn HCl nettverket som kan påvirke egenskapene og bla frisettingshastigheten og svelling.



Figur 31: PEC dannelse når nøytrale filmer has oppi PBS. Kitosan vil bli positivt (+) ladet og pektin negativt (-).

HCl-filmene ble også rehydrert under frisettingsforsøk og ble trolig nøytralisert i 0,2 M PBS. Kitosan og pektin nettverk har blitt studert i flere år, men det er ulike teorier om hvordan nettverket ser ut, hvordan kryssbindingen finner sted. Det har vært foreslått at kitosan kryssbinder pektin eller seg selv [91]. Siden PBS hadde ca. pH 6,8 vil kitosan være delvis positivt ladet, mens pektin trolig var tilnærmet fullstendig negativt ladet. Motsatte ladninger tiltrekker hverandre, og mellom pektin og kitosan vil det dannes ione-interaksjoner, såkalt et polyelektrolyttkompleks som vist i figur 33. Det vil bli dannet et ikke-støkiometrisk kompleks ettersom det er overskudd av positive polyioner [92]. Som beskrevet tidligere vil pektin pakke seg rundt kitosan og når begge blir ladet vil det dannes sterke ionebindinger. Strukturen vil forbli lik men at den holdes sterkere sammen enn før støping. Derfor antas dette som den mest riktige teorien bak nettverksdannelsen, og dette er i samsvar med forklaringen til Hiorth M. [89].



Figur 32: Ved pH over pKa verdien til pektin og under pKa til kitosan vil begge være ladet og PEC dannes [93].

Nettverkene som dannes ved HCl – og nøytrale filmer er en viktig faktor som virker inn på frisettingshastigheten. Sammenhengen er at filmene vil svelle ved rehydrering og frisettingen vil variere med svellegraden. Høy grad av svelling ville gi raskere permeabilitet og rask frisetting [3]. Ved dannelse av PEC membraner, pH 5.5, vil maks svelling oppnås etter kort tid i vann [94], noe som ble antatt kunne korreleres til nøytrale filmer og at maks svellingsgrad kunne oppnås i PBS. Visuelle resultater viste imidlertid at HCl-filmer svellet mer, ble gel-klump når de ble eksponert for frisettingsmediet PBS i 2,5 time. Nøytrale filmer derimot med PEC beholdt nærmest sin utgangsstruktur, noe som er i overensstemmelse med beskrivelsen til Yao K.D. et al som konkluderer med at svelling av PEC er pH avhengig. Ved pH <3 og pH >8 er det synlig svelling, mens ingen observert i pH-området 3-8. Systemet vil svelle vesentlig mer i surt miljø i forhold til basisk miljø [90]. Det antas at HCl- filmene svellet mer fordi kitosan vil forbli utstrakt og noe av pektin som allerede var i nærheten til kitosan vil danne ionebindinger med kitosan. Det vil være frastøtning mellom ubundet ladet pektin som resulterer i en mer utstrakt form. Nøytrale filmer vil derimot være låst av PEC og vil ikke kunne svelle noe særlig. I tillegg har svellingen og permeabiliteten tidligere blitt bevist avhengig av kitosan- og pektin typen, samt mengde av hver polymer. Filmer med stor mengde ikke-amidert LM sitrus pektin og liten mengde høy DM grads-kitosan gav minst svelling, dermed lavest permeabilitet. Dette ble forklart med at det ble dannet et tett PEC [3].

7.3 Nøytrale filmer – betydning av ulike faktorer.

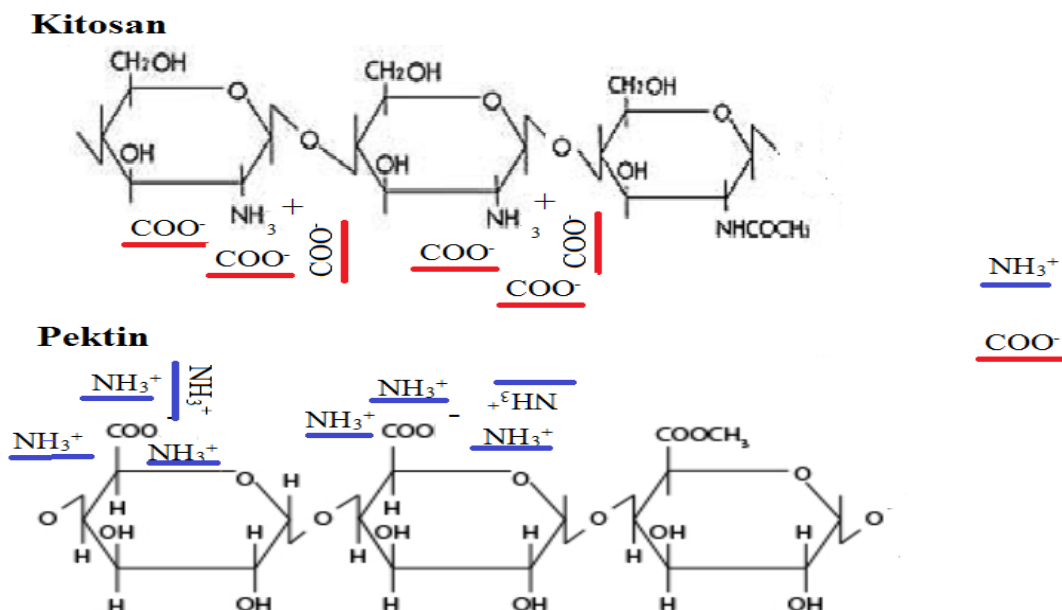
Ettersom frisettingen av CF fra HCl-filmer forekom raskt var det ønskelig å fremstille filmer ved nøytral pH da er det kjent at liposomer liker seg best ved denne pH-en [13]

Frisettingensprofilene vil bli omtalt senere i oppgaven. Som beskrevet i resultat delen (kapittel 6.4.1) var det ønskelig å skaffe en oversikt over systemet ved å variere pH-en med buffere.

Det ble først antatt at ionetypen og ionestyrken kan være av betydning for å lage filmer av god kvalitet ved høyere pH. Tabell 17 og 18 viser at det ikke var noen stor variasjon mellom de ulike ionetypene, ionestyrke, og pH. pH-en ble uansett rundt 6 etter sammenblanding. Dette forteller oss at kitosan avgjøre pH-en noe som henger sammen med at det er mer kitosan tilstede enn pektin. Samtidig vil det også si at PBS kapasiteten var lav i og med at kitosan klarte å ødelegge den. Det er en liten antydning til at fosfatbufferen med mange ioner gav mindre utfelling/krystallisering. En mulig forklaring på det kan være at ioneinteraksjonene kan blokkeres ved høyere ionestyrke. Det har tidligere i oppgaven, samt i mye litteratur blitt beskrevet at det ved $\text{pH} > 3$ dannes PEC [3, 79, 90]. Dannelse av dette komplekset er velkjent i andre system også blant annet mellom kitosan, positivt polyion, og andre polyanioner som alginat, xantan gummi, karragenan med flere [95]. Det er ulike beskrivelser av filmens utseende når komplekset dannes, blant annet vann uløselig gel-liknende utfelling [79], grov og ujevn overflate, og heterogen film [96], noe som er i samsvar med utseende til filmene i tabell 17 og 18. Et velkjent system som kan til en viss grad sammenliknes med kitosan-pektin er alginat- høymolekylærkitosan. Fellestrekkene er at både pektin og alginat blir negativt ladet ved høyere pH. Det vil også dannes PEC, og det vil på lik linje med pektin og kitosan dannes en suspensjon/utfelling av gel-aktige klumper og en heterogen film. Og filmer med grov overflate. Det interessante funnet som kommer frem i denne studien er at lavmolekylvekt kitosan gav en melkeaktig suspensjon i løsning og filmene fikk jevnere overflate [97]. Det har også vist seg at molekylvekten til kitosan, grad av metoksylering for pektin og blandingsforholdet mellom disse to polymerene er av betydning. I denne oppgaven har det ikke blitt lagt stor vekt på om det er HM- eller LM pektin og hvilken molekylvekt det var på kitosan [39], men det anvendte blandingsforholdet samt type polymer er det som gav best mucoadhesjon [2].

Jindal M. et al har forsøkt å lage filmer ved høyere pH, men har brukt ammoniumacetat, et flyktig salt, i både pektin- og kitosan løsningen ved sammenblanding for å forhindre PEC. Selv om den forskningsgruppen benyttet spraytørkemethoden, ble det antatt at dette også ville

fungere ved filmstøping [79]. I vann vil ammoniumacetat dissosieres til NH_3^+ og COO^- som vil kunne legge seg motsatt ladninger på polymerene som vist i figur 33.



Figur 33: Ladningsskjerming av kitosan og pektin

Tabell 19 og 20 viser at det ble en vesentlig bedring i resultatet, men ikke helt som ønsket. Valg av mengde ammoniumacetat ble validert ettersom det ifølge Jindal et al ikke ble presisert mengde, men kun at 5 M ammoniumacetat ble benyttet. Derfor ble det valgt å forsøke å redusere mengde ammoniumacetat, noe som ikke hjalp mye [79]. Det er begrenset med litteratur når det gjelder denne ladningsskjermingen. Et alternativ til ladningsskjerming er bruk av aceton. I alginat-kitosan filmer har aceton hatt som formål å gjøre kitosan mindre løselig og da vil struktur konformasjonen blir mindre utstrakt, slik at amino-gruppene blir mindre tilgjengelig for å danne interkasjoner med karboksylsyre-grupper på alginat. De beskriver at det ble dannet en suspensjon og at ureagerte stoffer ble vasket vekk [97]. Dette vil gi ukontrollert konsentrasjon av polymerene og av den grunn har det i denne oppgaven kontinuerlig vært etterstrebet å ha jevne filmer slik at både reproduserbarheten og at betingelsene er kontrollert.

Etter mange forsøk ble det konkludert med at det ikke var mulig å lage filmer med samme løsemiddel for både pektin og kitosan. Disse polymerene har ulike egenskaper og det var viktigere at alle stoffene var løst slik at dette ikke er en begrensende faktor. I tidligere studier har det blitt benyttet destillert vann til å løse opp pektin, og kitosan i eddiksyre [90, 94].

Det ble av den grunn foreslått at det var andre interaksjoner som må være tilstede da ladningsskjerming ikke gav tilfredsstillende resultater. Som tidligere beskrevet har pektin lett for å danne H-bindinger [89] av den grunn ble det antatt at slike interaksjoner ble dannet. Derfor ble det forsøkt å tilsette urea. Disse filmene ble meget fine, og det hvite laget i filmen løste seg raskt opp ved eksponering for vann. Samtidig ble det også forsøkt å få et grovt overblikk om varme kan være med på å avgjøre kvaliteten.

Hiorth M. har foreslått at gel-dannelse er temperatur avhengig og ved høyere temperatur vil det dannes blanke og fine geler [88]. Det vil ikke være noen binding dannet. Imidlertid ble ikke denne foreslåtte teorien overførbar til disse oppvarmede løsningene før støping under faktorforsøkene siden det ble dannet gel-klumper. Dette kan muligens forklares med at varmetilførsel førte til at ammoniumacetat fordampet raskt og førte til dannelse av ionebindinger i løsningen før støping.

Skjærkrefter antas å skape orden og strekker ut polymerene, og dermed forbedrer de intermolekylære interaksjoner. Dette vil gjelde fortynnede og halvkonsentrerte pektinløsningen [89]. Det ble også antatt at dette ville gjelde for dannelse av kombinasjonsløsningen av pektin og kitosan. Derfor ble det forsøkt å tilføre sterke skjærkrefter med stavmikser for å se om dette ville gi en løsning fri for gel-klumper. Kreftene var altfor sterke slik at det ble dannet mye skum og luftbobler som gav noe ujevne filme med luftrom.

Det ble derimot observert at ved sammenblanding var det ingen gel-klumper, men etter magnetrøring kom det gradvis flere. Derfor ble røretiden undersøkt som vist var av betydning.

Det reduserte faktorforsøket var ment som er screening. Valg av faktorer var basert på forforsøkene der flere ulike kombinasjoner ble undersøkt. Faktorforsøket viste at urea og ammoniumacetat var av betydning, og at utseende ikke hadde en klar sammenheng med mekaniske styrken filmene hadde. Den mekaniske styrken til nøytrale filmer var tilnærmet HCl-filmer med ibuprofen testet av Storfjell-Oven, men vesentlig lavere enn for de andre filmene [4]. Det er viktig å bemerke at formen, klebrighet, tykkelse, vekt og fordeling av polymeren var ulik for disse filmene fremstilt under faktorforsøket, og at disse resultatene kun er en grov oversikt over de mekaniske egenskapene. Det er derfor ikke mulig å fastsette noen konkrete slutninger basert på disse resultatene. pH-en ble undersøkt, men var tilnærmet lik for alle filmene og derfor ikke en signifikant faktor i forklaringen for filmdannelse.

Optimaliseringsforsøkene viste at gradvis tilsetning kitosanløsning til pektinløsningen gav de beste resultatene. Dette kan muligens forklares med at polymerene får tid til å ordne seg i forhold til hverandre gradvis, og man unngår en rask endring i konsentrasjonen og mengde løsning. Det er kjent at polymere danner bindinger spontant, derfor er det ønskelig å utsette en rask spontan reaksjon [98]. Den mekaniske puncturestyrken til disse filmene var høy, og var blant filmene som utviste best styrke. Det kan indikere dannelse av et tett og sterkt nettverk der polymerene har ordnet seg i sin mest stabile konformasjon.

7.4 Frisetting og liposom stabilitet

7.4.1 HCl-filmer

Det ble på forhånd antatt at liposomene, LipoCF-PBS, ville ødelegges når de ble tilsatt polymerløsningen laget i 0,1 M HCl (HCl filmer), og en rask frisetting av CF ville forekomme. Bakgrunnen for denne antagelsen var at det tidligere har blitt gjort studier på stabiliteten til liposomene i surt miljø, GI væske. Studiene viste at liposomene ble destabilisert, desintegrerte og utviste større lekkasje når det ble utsatt for surt miljø [6, 99, 100]. I tillegg katalyseres hydrolysen av fosfolipider i surt miljø som fører til liposom ødeleggelse, men ifølge Crommelin D. J. A et al. vil varigheten på denne reaksjonen strekke seg over timer, dager [9, 18]. Resultatet i figur 19 bekrefter antagelsen om at rask frisetting følger 1.ordens frisetting, men dette er ikke verifisert. Ved 1. orden vil frisettingen være avhengig av konsentrasjonen av substansen, men det kan også være tilgjengelig overflateareal og diffusjonslengde som også gir opphav til 1.ordens frisetting. Sist nevnte vil bli omtalt senere i oppgaven [101].

Figur 19 viser at i løpet av 150 minutter ble kun ca. 60 % frisatt fra HCl-filmene med liposomer, noe som kan forklares med ulike teorier. Liposomenes stabilitet av egg fosfatidylkolin /kolesterol (EPC/chol) med innkapslet bovine serum albumin i pH 2 har tidligere blitt studert. Det viste seg at etter 3 timer ble 60-65 % albumin frisatt. Det er tilnærmet lik den mengden som ble observert av CF fra LipoCF-PBS i HCl- filmer [6]. Selv om albumin er et protein og er mye større enn CF kan det trekkes paralleller om at lav pH i flere tilfeller kan se ut til å redusere den totale mengde substans. I tillegg er soya PC liposomer mer ustabile på grunn av høyere andel av fettsyrekjeder med dobbeltbindinger enn EPC/chol [9].

En av flere mulige forklaringer bak en slik frisettingsprofil kan være at CF har felt ut i polymerløsningen. CF er kun løselig ved pH>5 og det er kun oppløst CF som fluorescerer [63]. Noyes whitney likning forklarer oppløsningshastigheten til et stoff:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{kA}{h} (C_s - C)$$

dC/dt er oppløsningshastigheten til en partikkel, k er diffusjonskoeffisienten til stoffet i løsningen i PBS, A er overflatearealet til partikkelen i løsningen, h er tykkelsen på diffusjonslaget på partikkelen, C_s er metningskonsentrasjonen på stoffet i løsningen, og C er konsentrasjonen av stoffet i løsningen [102]. Ved utfelling vil det ta lenger tid å oppnå stor forskjell mellom C_s og C som er en drivkraft bak oppløsningen. Filmene med en liten mengde utfelt CF blir satt oppi 100 ml PBS som antageligvis vil være nok til å løse opp all CF, men trolig ikke innen den undersøkte tidsperioden på 2,5 time.

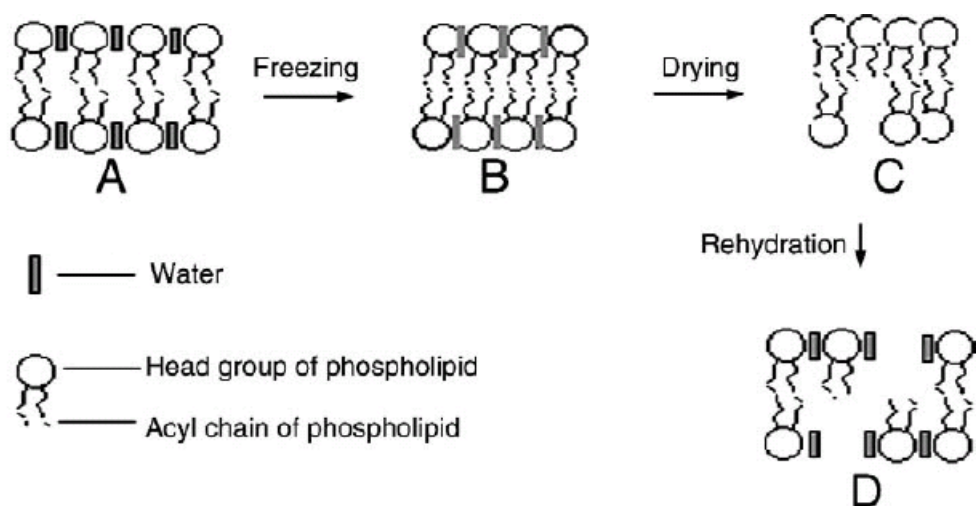
En annen teori som trolig er av større betydning frisettingsprofilen er diffusjonen gjennom kombinasjonsfilmen, samt mulige interaksjoner som kan oppstå. Higuchi's likning beskriver ensrettet diffusjon av oppløst substans i en matriks/et komplekst system, i dette tilfellet over filmen:

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{3}} (2A - \varepsilon C_s) * C_s * t$$

hvor Q er mengde frigjort stoff pr.flateenhet etter tiden t , D er diffusjonskoeffisienten for substans i oppløsningsvæsken, \mathfrak{S} er tortuositeten til nettverket/ filmen og ε er porøsiteten til matriks/filmen, A er total mengde stoff pr. volumenhet og C_s er løseligheten til stoffet i løsemidlet [103]. Diffusjonen avhenger av porestørrelsen og porelengden, samt interaksjoner som dannes mellom CF og pektin, kitosan og fosfolipidmembranen. Jo høyere tortuositeten er desto flere svinger må substansen igjennom, og dermed forsinkes frisettingen mer. I tillegg vil mindre porøsitet gi mindre poreåpninger og raskere frisetting. Pektin har en tendens til å danne H-bindinger [3] og kan i dette tilfellet ha dannet det med CF, og på den måten forhindret fullstendig frisetting av CF. Det er ikke sannsynlig at kitosan danner ione-interaksjoner med CF i PBS da kitosan ved denne pH-en ikke er ladet. Imidlertid finnes det litteratur på at CF danner hydrofobe interaksjoner med fosfolipidmembranen som også kan ha gitt lavere frisettingsmengde [63]. Miceller kan også dannes når liposomene brytes og kan

fange CF, og dermed gi lavere utbytte. Både antagelsene om hydrofob interaksjon med fosfolipid membranen og micelledannelse ble avkreftet da frisetting fra filmer som inneholder kun CF viste tilnærmet samme frisettingsprofil som de med lipoCF-PBS. Det ble konstatert at diffusjonshastigheten er av størst betydning, og at oppløsningshastigheten er mindre betydningsfull.

Et annet moment som kan påvirke liposomene og derav frisettingen, er at liposomenes følsomhet ovenfor osmotisk trykk og tørke. Etter støping dannes filmer ved å gjennomgå en tørkeprosess. Denne prosessen kan delvis korreleres til frysetørking av liposomer. Ved frysetørking vil liposomene i utgangspunktet være i en løs struktur med overskudd av vann. Deretter fryses vannet til is og dette påvirker liposomene. Isen sublimerer til vanndamp ved lavt trykk og en mer kompakt struktur oppnås med mulige defekter. Når de deretter rehydreres vil strukturen bli mer lekk, som vist i figur 34. I vårt tilfelle vil filmene, og derav liposomene, etter tørkeprosessen rehydreres i frisettingsmediet, og kan av den grunn bli mer lekk [104].



Figur 34: Frysetørking av liposomer og rehydrering [104].

I mastergradsavhandlingen til Storfjell-Oven ble det forsøkt å innkapsle substansene paracetamol, ibuprofen og lidokain i HCl-filmer. Dette kan sammenliknes med CF frisettingen fra samme HCl-filmer. CF vil ved nøytral pH være uladet siden den har en pKa verdi på 6,5. Paracetamol var den uladete substansen hos Storfjell-Oven Å., og etter ca. 20 minutter var 90 % frisatt. CF ble derimot ikke fullstendig frisatt etter 2,5 time som det kan være flere årsaket til som beskrevet tidligere i oppgaven. Det interessante var at ibuprofen sin frisettingsprofil lignet på CF frisettingen selv om tiden til 50% frisatt var for ibuprofen 37 minutter mens for CF var den 100 minutter. En mulig forklaring på dette er at pH-en kan være lavere inni film slik at CF blir negativt ladet og danner like interaksjoner som ibuprofen[4].

Dersom man ser på resultatene overordnet er det antydning til at liposomer vil bremse frisettingshastigheten, men som tidligere nevnt ble det benyttet ulike mengder forhold og ulike substanser med helt ulike egenskaper der CF er mer hydrofob sammenliknet med de andre substansene.

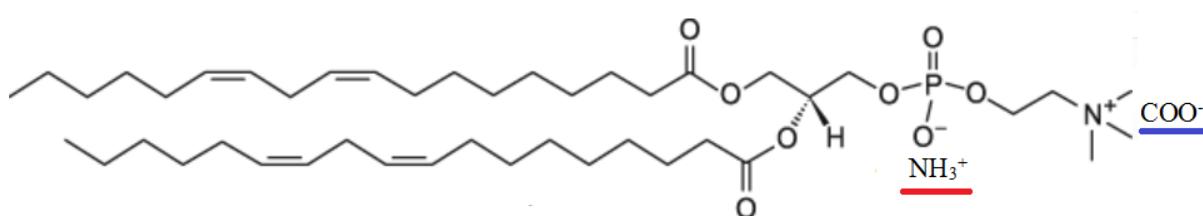
7.4.2 Nøytrale filmer

Formålet med å lage nøytrale filmer var å kunne innkapsle liposomer uten at de går i stykker som tidligere omtalt. Det var av den grunn antatt at frisettingen ville være drastisk forlenget fordi CF måtte igjennom to systemer. Først gjennom intakte liposomer og deretter igjennom filmen, i motsetning til HCl der CF kun måtte igjennom filmene ettersom liposomene antas å ikke være ødelagte. Det har blitt gjort en del studier på frisetting gjennom to systemer tidligere. Systemet som likner mest på dette er tilsetning av liposomer til hydrogeler, selv om det riktignok ikke kan direkte sammenliknes. Hurler J. viser til en studie der liposomer ble laget ved pH 7,4 og kitosan hydrogelen ved pH 4. Innkapslet fluorescens markører fluorescerte ikke inni liposomene, men først etter frisetting til hydrogelen. Denne frisettingen ble analysert med fluoremeter og det viste seg at frisettingen fra liposomene til kitosan hydrogel strekker seg over mange timer, avhengig av liposom typene. Ulike liposomtyper vil danne ulik interaksjoner med hydrogelen og derav observeres ulik frisetting [105]. Resultatet i figur 27 viste derimot en rask frisetting, der alt var frisatt etter 2,5 time. Frigivelsen var noe saktere enn for filmer med kun tilsatt CF. Det kan som tidligere omtalt skyldes interaksjoner mellom CF og fosfolipid membranen [63]. Resultatet viste også tydelig en umiddelbar frisetting fra filmer med kun CF, noe som kan forklares med at CF inni liposomene hadde en lenger vei å diffundere ut enn kun CF. I filmer med kun tilsatt CF vil CF-en ligge i overflaten og være klar til frisetting. Siden dette ikke var som forventet ble det forsøkt å tilsette liposomer uten film til PBS, og måle frisettingen fra disse. Det har tidligere studier blitt vist at frisetting fra DPPC(dipalmitoyl phosphatidylcholine – mettede fettsyrekjeder) liposomer med innkapslet 1,5 mM CF ved 35°C vil frisettingen strekke seg over flere dager, nærmere måneder [86]. Den samme trenden ble overraskende ikke sett i dette tilfellet, men var ganske lik som for bare CF i film. Burst-release for liposomer uten film kan trolig forklares med at liposomene i utgangspunktet var lekk, noe som delvis kan avkrefte at tørkeprosessen er årsaken til hurtig frisetting. Liposomene ble laget i hydreringsmiddelet for å unngå stor forskjell i osmotisk trykk når liposomene ble tilsatt polymerløsningen. Det ble antatt at liposomene ikke tålte for stor trykkforskjell, siden man ofte ser på liposomer som noe

kroppslignende [13]. Trykkforskjellen mellom liposomenes kjerne, enten når de er tilsatt film eller ikke, og PBS er stor. Det vil være flere ioner inni kjernen, hypertont, slik at vannet fra PBS vil trekke inn, og dette vil kunne forårsake sprekking av liposomer. I følge tidligere studier kan liposomer tåle en forskjell på 40 atm [106] og 80atm [107] før de blir fullstendig ødelagt. En 80atm vil tilsvare 1,5M NaCl i forskjell. I følge Barenholz et al. vil det være lekkasje fra liposomene ved vesentlig lavere trykk, noe som kan muligens gi en forklaring på resultatene for alle liposomene fremstilt i denne oppgaven. Soya PC – liposomene vil antagelig tåle mindre trykk siden de ikke inneholder kolesterol, enn trykket ble undersøkt på DSPC/chol [107]. Kolesterol introduserer rigiditet og stabilitet til liposomene [13]. Det vil være et hypertont miljø i lipoCF-PBS i forhold til HCl-polymerløsningen. Lipidlaget hydreres med PBS og når disse liposomene tilsettes polymerløsningen laget i HCl vil det osmotiske trykket trolig være hyertont inni liposomene i forhold til utenfor, noe som vil resultere i økt lekkasje. Forskjellen i osmotisk trykk er mindre enn for LipoCF-hydr.

Liposom dannelsen som finner sted i hydreringvæsken vil bli påvirket av urea og ammoniumacetat. Ammoniumacetat kan skjerme ladningene på hodegruppene til fosfolipidet som vist i figur 35 og forstyrre tettpakking av liposomene. Dette er ikke meget sannsynlig ettersom størrelsen på liposomene etter ekstrudering var rundt 200 nm. Det ble forsøkt å måle størrelsen på lipoCFhydr som hadde blitt stående i kjøleskapet minst 1 uke og da viste det seg at de hadde økt i størrelsen. Smistad G. et al beskriver at DPPC liposomer som ikke var coatet med pektin utviste en økning i størrelse. Dette kan være forårsaket av aggregering av positive liposomer på grunn av ionestyrken var høy og frastøtende krefter ble mindre [9, 86].

Resultatet vist i figur 13 bekrefter en økning i zetapotensialet ved økt mengde hydreringsvæske. Det henger godt samme med tidligere funn der tettheten på overflateladningen økte med økte ionestyrke[108].



Figur 35: Ladningsskjerming på fosfolipidene med ammoniumacetat [109].

Et annet aspekt til at liposomene fremstilt i hydreringsmiddel kan være tilstedeværelse av urea. Selv om urea bryter H-bindinger lett, kan urea også bryte hydrofobe interaksjoner [110].

Hale-gruppene på fosfolipider danner hydrofobe interaksjoner og danner dermed en tett lipidvegg, som med tilstedeværende urea vil kunne brytes/ikke dannes. Ergo vil også dette gi en raskere frisetting av CF fra disse liposomene.

Figur 28 viser at fluorescensen var noe lavere i de brønnene som ble tilsatt triton. Triton med sin funksjonalitet vil ødelegge eventuelle liposomer som vandrer ut av film-nettverket. Ettersom fluorescensen ikke så ut til å øke i prøver tilsatt triton, ble det konkludert med at liposomene som var intakt ikke vandret ut.

7.5 Reløsning av filmer

I litteraturen er det beskrevet at HCl-filmer løses raskt i 0,1 HCl [3, 4], men at de ikke løser seg i vann [3]. Dette kan muligens forklares med at H-bindinger som dannes brytes lettere i 0,1 HCl, men i vann vil det kunne dannes PEC som holder nettverket sammen. De nøytrale filmene tålte derimot både sure og basiske forhold, slik det er i GI-trakten, samt økt ionestyrke og tilføring av shear-krefter. De utviste i tillegg sterke puncture styrke. Formålet var å finne ut innkapslingsgraden av CF ved å reløse filmene, ble ikke oppnådd, men i stedet ble dette uventede funnet oppdaget. Dette funnet kan muligens forklares med at nettverksordningen og stryken på nettverket er vesentlig annerledes i forhold til HCl-filmer. Trolig skyldes dette PEC.

7.6 Videre forskning

Ved videre forskning er det viktig å reprodusere filmene siden det ikke har blitt foretatt noen verifisering på det. I tillegg er det naturlig å forsøke å forbedre liposom fremstillingen. Første steg vil være å innkapsle lipoCF-PBS i nøytrale filmer, og tilsett NaCl til PBS slik at det osmotiske trykket blir likt. Neste steg kan være å coate liposomer slik at de kan interagere med polymernettet og deretter fluorescensmerke fettsyrene slik at man har kontroll på hva som frisettes. For å få et mer eksakt mål på mengden CF som frigis, bør enzymer tas i bruk for å bryte nettverket. Kombinasjonsfilmene derimot bør fremstilles uten urea, men med samme mengde ammoniumacetat der polymerløsningene sammenblandes gradvis.

8. Konklusjon

I tidligere arbeid har det blitt konkludert med at pektin- og kitosan kombinasjonsfilmer har et stort potensial som mucoadhesiv formulering. Dette er av liten nytte dersom frisettingen av virkestoff ikke forlenges ytterligere. Det har også blitt konkludert i en master oppgave at ladede virkestoff forlenger frisettingen i motsetning til uladede.

I denne oppgaven har resultatene vist at pH-en må være tilnærmet nøytral for at liposomer skal kunne inkorporeres i kombinasjonsfilmene. Bakgrunnen for dette er at liposomer lastet med en fluorescerende markør inkorporert i castet pektin-kitosan kombinasjonsfilm fremstilt ved pH 1 utviste rask frisetting. Ved nøytral pH ble det imidlertid dannet faseseparasjon i kombinasjonsfilmene. For å overkomme dette problemet ble ladningene på kitosan og pektin skjermet med et flyktig salt, og H-bindinger ble brutt med urea. Resultatet viste at de nøytrale kombinasjonsfilmene ble blanke og jevne, noe de også var ved tilsetning av liposomer. Det viste seg at det dessverre ikke ble noe mer forlenget frisetting av fluorescensmarkøren fra nøytrale kombinasjonsfilmer. Frisettingen var tilnærmet lik for filmer med og uten liposomer, men det overraskende var at frisettingen av fluorescensmarkøren fra liposomer til frisettingsmediet var meget rask.

Det ble konkludert med at ingen forlenget frisetting ble observert fra nøytrale kombinasjonsfilmer skyltes liposom-fremstillingen. Liposomene ble mest sannsynlig lekket på grunn av en osmotisk gradient, brytning/hindring av bindinger forårsaket av hydreringsmidlet. I tillegg gjennomgikk filmene en tørkeprosess som kan ha påvirket liposomene. Det ble også dratt slutning om at kombinasjonsfilmene var meget sterke ettersom de ikke ble brutt under ulike påkjenninger.

9. Litteraturliste

1. Hagesaether, E. , *Mucoadhesive properties of pectin, Effect of type of pectin and drug delivery system*, in *Department of Pharmaceutics, University of Oslo*, (2008). s. 7-57.
2. Hagesaether, E., Hiorth, M. og Sande, S. A. , *Mucoadhesion and drug permability of free mixed films of pectin and chitosan: An in vitro and ex vivo study*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2009). **71**: s. 325-331.
3. Hiorth, M., Tho, I. og Sande, S. A. , *The formation and permability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2003). **56**: s. 175-181.
4. Storfjell-Oven, Å., *Kontrollert frisetting fra mucoadhesive pektin-kitosan kombinasjonsfilmer*. Oslo, Universitetet i Oslo, (2009). s. 33-106.
5. Lasic, D. D., *Liposomes: From Physics to Applications*. Amesterdam, Elsevier Science B. V. , (1993). (1. utg.): s. 310.
6. Taira, M. C., Chiaramoni, N. S., et al. , *Stability of Liposomal Formulations in Physiological Conditions for Oral Drug Delivery*. Taylor & Francis healthsciences, (2004). **11**: s. 123-128.
7. EuropeanPharmacopea, *5.17.1 Recommendations on Dissolution Testing*. Via <http://online.pheur.org/EN/entry.htm>. Hentet 16.08.2014
8. Vishvakrama, P. og Sharma, S., *Liposomes: An Overview*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, (2012). **3**: s. 1074-1084.
9. Grit, M. og Crommelin, D. J. A., *Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability*. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. , (1993). **64**: s. 3-18.
10. Crommelin, D. J. A., Hennink, W. E. og Storm, G. , *Drug Targeting Systems: Fundamentals and Applications to Parenteral Drug Delivery, i Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, Hillery, A. M., Lloyd, A. W. og Swarbrick, J. (ed.). London, Taylor & Francis, (2001). (1. utg.): s. 119-120.
11. Felleskatalogen, *J02A Antibiotika til systemisk bruk og L01D Cytotoksiske antibiotika og lignende substanser*. www.felleskatalogen.no. Hentet 14.08.2014.
12. Zeineldin, R. , *Liposomes*. <http://www.reemazeineldin.com/Liposome.html>. Hentet 17.08.2014.
13. Lasic, D. D. , *Liposomes: From Physics to Applications*. . Amesterdam, Elsevier Science B. V. , (1993). (1. utg.): s. 3-42.
14. Lasic, D. D. , *Liposomes: From Physics to Applications*. Amesterdam, Elsevier Science B. V. , (1993). (1. utg.): s. 43-62.
15. Florence, A. T. og Attwood, D. , *Physicochemical Priciples of Pharmacy*. London, Pharmaceutical Press, (2006). (4. utg.): s. 178-228.
16. Hoogevest, P. v., Leigh, M. og Fahr, A. , *Liposomes as Intravenous Solubilizers for Poorly Water-Soluble Drugs, i Drug Deilivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, Douroumis, D. og Fahr, A. (ed.). John Wiley & Sons, Ltd. , (2013). (1. (utg.)): s. 37-38.
17. Crommelin, D. J. A. , *Liposomes, i Colloidal Drug Delivery Systems*, Jörg Kreuter (ed.). New York, Drugs And The Pharmaceutical Sciences (1994). **66**: s. 73-157.
18. Zuidam, N. J., Winden, E. v., Vrueth, Remco d. og Crommelin, D. J. A. , *Stability, Storage, and Sterilization of Liposomes, i Liposomes A Practical Approach*, Torchilin, V. og Weissig, V. , New York, Oxford University Press, (2003). (2. (utg.)): s. 149-164.
19. Attwood, D. , *Disperse Systems, i Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*, Aulton, M. E. (ed.). USA, Churchill Livingstone Elsevier, (2007). (3. utg.): s. 70-98.

20. Lasic, D. D., *Liposomes: From Physics to Applications*, (1993). (1. utg.): s. 185-210.
21. Florence, A. T. og Attwood, D. , *Physicochemical Principles of Pharmacy*. London, Pharmaceutical Press, (2006). (4. utg.): s. 230-272.
22. Attwood, D., *Disperse Systems, i Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture Of Medicines*, Aulton, M. E. (ed.). . USA, Churchill Livingstone Elsevier, (2002), (2. (utg.)): s. 70-100.
23. Malvern, *Zetasizer 2000/3000: Zeta Potential measurements*. Malvern Instruments Ltd., (2000). (2.0).
24. Center, Leeds Innovation, *Zeta Potential- Electrophoresis*. Escubed Limited s. [http://www.escubed.co.uk/sites/default/files/zeta_potential_\(an011\)_electrophoresis.pdf](http://www.escubed.co.uk/sites/default/files/zeta_potential_(an011)_electrophoresis.pdf). Hentet 22.06.2014.
25. Malvern, *Zetasizer 1000/2000/3000: PCS Theory*. Malvern Instruments Ltd., (1996).
26. Malvern, *Dynamic Light Scattering Common Terms Defined*. Malvern Instruments Limited, (2011).
27. Florence, A. T. og Attwood, D. , *Physicochemical Principles of Pharmacy*. London, Pharmaceutical Press, (2006). (4. utg.): s. 274-326.
28. Paulsen, B. S. og Barsett, H., *Bioactive Pectic Polysaccharides*. Advances in Polymer Science, (2005). **186**: s. 69-101.
29. Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. , *The chemical structure of pectins, i Pectins and their manipulations*, Seymore, G. B. og Knox, J. P. (ed.). U.S.A og Canada, Blackwell publishers, CRC Press, (2000). (1. utg.): s. 1-29.
30. Biologists, The American Society of Plant, *Plantphysiology*, <http://www.plantphysiol.org/content/153/2/384/F1.large.jpg>. Hentet 13.07.2014.
31. Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. og Rao, M. A. , *Chemistry and uses of pectin- A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, (1997). **37:1**: s. 47-73.
32. Allwyn, S. R. A., Rubila, S., Jayabalan, R. og Ranganathan, T. V. , *A Review in Pectin: Chemistry due to General Properties of Pectin and its Pharmaceutical Uses*. Scientificreports, (2012). **1:550**: s. 207-228.
33. Norge, Orkla Foods, [http://www.stabburet.no/Merker-Produkter/Merker/Nora/\(productId\)/46880](http://www.stabburet.no/Merker-Produkter/Merker/Nora/(productId)/46880). Hentet 20.08.2014.
34. Kubo, W., Miyazaki, S., Dairaku, M., Togashi, M., Mikami, R. og Attwood, D. , *Oral sustained delivery of ambroxol from in situ-gelling pectin formulations*. International journal of Pharmaceutics, (2004). **271**: s. 233-240.
35. Tho, I., Sande, S.A. og Kleinebudde, P. , *Pectinic Acid, A Novel Excipient For Production Of Pellets*, (2002). http://www.herbstreith-fox.de/fileadmin/tmpl/pdf/funde/FuE_Pectinic_Acid.pdf. Hentet 01.07.2014.
36. Liu, L., Fishman, M. L. og Hicks, K. B. , *Pectin in controlled drug delivery - a review*. . Springer Link, (2007). **14**: s. 15-24.
37. Sande, S. A. , *Pectin-based oral drug delivery to the colon*. Expert Opinion on Drug Delivery, (2005). **2**: s. 441-450.
38. Thirawong, N., nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S. og Sriamornsak, P. , *Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: A in vitro evaluation using texture analyzer*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2007). **67**: s. 132-140.
39. Hagesaether, E. og Sande, S. A. , *In Vitro Measurements of Mucoadhesive Properties of Six Types Of Pectin*. Drug Development and Industrial Pharmacy, (2007). **33**: s. 417-425.

40. Takahashi, Y., Takeda, C., Seto, I., Kawano, G. og Machilda, Y. , *Formulation and evaluation of lactoferrin bioadhesive tablets*. International Journal of Pharmaceutics, (2007). **343**: s. 220-227.
41. Valenta, C., *The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, (2005). **57**: s. 1692-1712.
42. Klemetsrud, T. Jonassen, H., Hiorth, M., Kjørniksen, A.-L. og Smistad, G. , *Studies on pectin-coated liposomes and their interaction with mucin*. Colloids and Surface B: Biointerfaces, (2013). **103**: s. 158-165.
43. Li, Q. Dunn, E. T., Grandmaison, E. W. og Goosen, M. F. A. , *Applications and Properties of Chitosan*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, (1992). **7**: s. 370-397.
44. George, M. og Abraham, T. E. , *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review*. Journal of Controlled Release, (2006). **114**: s. 1-14.
45. Online, Scientific Electronic Library, *Chitosan*.
<http://www.scielo.cl/fbpe/img/bscq/v45n2/img118.jpg>. Hentet 02.06.2014.
46. Sorlier, P., Denuziere, A., Viton, C. og Domard, A. , *Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan*. . Biomacromolecules (2001). **2**: s. 765-772.
47. Jiasheng, T. og Shien, Y. , *Polymers in oral modified release systems, i Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery, Theory to practice*, Wen, H. og Park, K. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons (1. utg.): s. 71-87.
48. Alsarra, I. A. , *Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds* International Journal of Biological Macromolecules, (2009). **45**: s. 16-21.
49. Illum, L., Farraj, N. F. og Davis, S. S. , *Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs*. Pharmaceutical Research, (1994). **11**: s. 1186-1189.
50. Dodane, V. og Vilivalam, V. D. , *Pharmaceutical application of chitosan*. Pharmaceutical Science & Technology Today, (1998). **1**: s. 246-253.
51. Bhattarai, N., Gunn, J. og Zhang, M. , *Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, (2010). **62**: s. 83-99.
52. Genta, I., Costantini, M. ASti, A., Conti, B. og Montanari, L. , *Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres*. Carbohydrate Polymers, (1998). s. 81-88.
53. Henriksen, I., Green, K. L., Smart, J. D., Smistad, G. og Karlsen, J. , *Bioadhesion of hydrated chitosans: An in vitro and in vivo study*. International journal of Pharmaceutics, (1996). **145**: s. 231-240.
54. Wang, Q. og Cui, S. W., *Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides, i Food Carbohydrates Chemistry, Physical Properties and Applications*, Cui, S. W. (ed.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, (2005). (1. utg.): s. 162-214.
55. Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J. og Hicks, K. B., *Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route*. Biomaterials, (2003). **24**: s. 3333-3343.
56. Patricia miranda, S., Garnica, O. Lara-Sagahon, V. og Cardenas, G. , *Water Vapor Permeability And Mechanical Properties Of Chitosan Composite Films*. Journal of Chilean Chemical Society, (2004). **49**: s. 173-178.
57. Hoagland, P. D. , *Films from Pectin, Chitosan, and Starch, i Macromolecular interactions in food technology : developed from a symposium sponsored by the ACS Division of Agrochemicals at the 1995 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Parris, N. (ed.). . Washington, DC, American Chemical Society, (1996). (1. utg.): s. 145-154.

58. European Pharmacopea, 8.0 *Oromucosal preparations*. Via <http://online.phEur.org/EN/entry.htm>. Hentet 15.09.14.
59. Preis, M., Woertz, C., et al., *Oromucosal film preparations: classification and characterization methods*. Expert Opinion on Drug Delivery, (2013). **10**: s. 1303-1317.
60. Hoogstraate, J., Benes, L., et al., *Oral Trans-mucosal Drug Delivery, i Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*, Hillery, A. M., Lloyd, A. W. og Swarbrick, J. (ed.). London, Taylor & Francis, (2001). (1. utg.): s. 176.
61. Electronic Medicines Compendium, *Setofilm 8 mg Orodispersible Films*. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/28019>. Hentet 20.08.14.
62. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. , *Legemiddelanalyse*. Vigmostad & Bjørke AS, (2004). (1. utg.): s. 89-91 og 174-178.
63. Zuidam, N. J., Vrueth, Remco d. og Crommelin, D. J. A., *Characterization of liposomes, i Liposomes A Practical Approach*, Torchilin, V. P. og Weissig, V. (ed.). New York, Oxford University Press, (2003). (2. utg.): s. 31-77.
64. Shimadzu Excellence in Science, Analytical and Measuring Instruments *Preparing Buffer Solutions*. <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/ctalk/38/38lab.html>. Hentet 22.09.2014.
65. Oklahoma, The University of, *Detailed Information and Comparison of Preparation Techniques, Buffers*. <http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/buffers.html>. Hentet 22.09.2014.
66. Austarheim, I., *I. Biologisk aktiv polysakkarider fra Glunus oppositifolius (L.) Aug. DC II. Ethnopharmacological survey in Mali*. Oslo, Universitetet i Oslo, (2007). s. 14.
67. 2.0, Micromedex^(R), *Pectin*. http://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/ND_T/evidencexpert/ND_PR/evidencexpert/CS/019813/ND_AppProduct/evidencexpert/DEPLICATIONSHIELDSYNC/EB06EE/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.IntermediateToDocumentLink?docId=5447-c&contentSetId=30&title=Pectin&servicesTitle=Pectin. Hentet 01.07.2014.
68. Jarvis, M. C. , *Biophysical properties of pectins, i Pectins and their manipulations*, Seymore, G. B. og Knox, J. P. (ed.). U.S.A og Canada, Blackwell publishers, CRC Press, (2000). (1. utg.): s. 99-130.
69. Hagesaether, E. , *Formuleringsfaktorer for pektin og kitosan kombinasjonsfilmer*. Oslo, Universitetet i Oslo, (2002). s. 30.
70. Bøyum, S., *Stabilitet av pektindekkede liposomer for lokalbehandling av munnhulen*. Oslo, Universitetet i Oslo, (2010). s. 61.
71. Ghaffari, A., Navaee, K., et al., *Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2007). **67**: s. 175-186.
72. Hoagland, P. D. og Parris, N., *Chitsan/Pectin Laminated Films*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, (1996). **44**: s. 1915-1919.
73. Hagesaether, E. og Sande, S. A., *Effect of Pectin Type and Plasticizer on In Vitro Mucoadhesion of Free Films*. Pharmaceutical Development and Technology, (2008). **13**: s. 105-114.
74. GmbH, Quantifoil Instruments, *Creating constant air humidity in closed vessels*. <http://www.qinstruments.com/uploads/media/humidity.pdf>. Hentet 22.09.2014.
75. Aschi, M., D'Archivio, A. A., et al. , *Physicochemical properties of fluorescent probes: experimental and computational determination of the overlapping pKa values of carboxyfluorescein*. Journal of Organic Chemistry, (2008). **73**: s. 3411-3417.

76. Lopez, O., de la Maza, A., et al., *Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100*. FEBS Letters, (1998). **426**: s. 314-318.
77. Sila, M. og Weiner, N. , *Effects of Triton X-100 concentration and incubation temperature on carboxyfluorescein release from multilamellar liposomes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, (1986). **859**: s. 165-170.
78. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. , *Legemiddelanalyse*. Vigmostad & Bjørke AS, (2004). (1. utg.): s. 37-66.
79. Jindal, M., Kumar, V., et al., *An insight into the properties of Aegle marmelos pectin-chitosan cross-linked films*. International Journal of Biological Macromolecules, (2013). **52**: s. 77-84.
80. Connor, J., Yatvin, M. B. og Huang, L. , *pH-sensitive liposomes: Acid-induced liposomes fusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, (1983). **81**: s. 1715-1718.
81. McMurry, J. og Fay, R. C. , *Chemistry*. New Jersey, Pearson Education, Inc, (2004). (4. utg.): s. 634.
82. Bekhradnia, S., Knudsen, Z., et al., *Structure, swelling, and drug release of thermoresponsive poly(amidoamine) dendrimer-poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels*. Journal of Materials Science, (2014). **49**: s. 6102-6110.
83. Sakai, T. , *Huggins Constant k' for Flexible Chain Polymers*. Journal of Polymer Science, (1968). **6**: s. 1535-1549.
84. Christensen, P. E. , *Methods of Grading Pectin in Relation to the Molecular Weight (Intrinsic Viscosity) of Pectin*. Journal of Food Science (1953). **19**: s. 163-172.
85. Hiorth, M., Kjøniksen, A. -L., et al., *Structural and dynamical properties of aqueous mixtures of pectin and chitosan*. European Polymer Journal, (2005). **41**: s. 1718-1728.
86. Smistad, G., Bøyum, S., et al., *The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems*. Carbohydrate Polymers, (2012). **90**: s. 1337-1344.
87. Bussemer, T., Peppas, A. og Bodmeier, R. , *Time-Dependent Mechanical Properties of Polymeric Coatings Used in Rupturable Pulsatile Release Dosage Forms*. Drug Development and Industrial Pharmacy, (2003). **29**: s. 623-630.
88. Hiorth, M., Kjøniksen, A. -L., et al., *Thermoreversible Gelation of Aqueous Mixtures of Pectin and Chitosan*. Rheology. Biomacromolecules, (2003). **4**: s. 337-343.
89. Hiorth, M., *Characterization of pectin and chitosan interactions in film formation and drug delivery systems, in Department of pharmaceutics, University of Oslo*, (2005). s. 9-47.
90. Yao, K. D., Tu, H., et al., *pH-Sensitivity of the swelling of chitosan-pectin polyelectrolyte complex*. Die Angewandte Makromolekulare Chemie, (1997). **245**: s. 63-72.
91. Berger, J., Reist, M., et al., *Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2004). **57**: s. 19-34.
92. Kramarenko, E. Y., Khokhlov, A. R. og Reineker, P, *Stoichiometric polyelectrolyte complexes of ionic block copolymers and oppositely charged polyions*. The Journal of Chemical Physics, (2006). **125**: s. 194902.
93. Coimbra, P., Ferreira, P., et al., *Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications*. International Journal of Biological Macromolecules, (2011). **48**: s. 112-118.

94. Bernabe, P., Peniche, C. og Arguelles-Monal, W., *Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking*. Polymer Bulletin, (2005). **55**: s. 367-375.
95. Hamman, J. H, *Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potensial Carrier Materials in Drug Delivery Systems*. Marine Drugs, (2010). **8**: s. 1305-1322.
96. Ofori-Kwakye, K. og Fell, J. T., *Leaching of pectin from mixed films containing pectin, chitosan and HPMC intended for biphasic drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, (2002). **250**: s. 251-257.
97. Yan, X., K. E. og L, L., *Chitosan-Alginate Films Prepared with Chitosans of Different Molecular Weights*. Journal of Biomedical Materials Research, (2001). **58**: s. 358-365.
98. Birch, N. P. og Schiffman, J. D., *Characterization of Self-Assembled Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Formed from Chitosan and Pectin*. Langmuir, (2014). **30**: s. 3441-3447.
99. Simoes, S., Moreira, J. N. et al *On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times*. Advanced Drug Delivery Reviews, (2004). **56**: s. 947-965.
100. Hu, S., Niu, M., et al. , *Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media*. International journal of Pharmaceutics, (2013). **441**: s. 693-700.
101. Pharmacy, Raghu College of, *Differences between Zero-order kinetics and First-order kinetics*.
http://www.pharmainfo.net/files/groupsimages/differences_between_zero_and_first_order_kinetics.pdf, Hentet 27.08.2014.
102. York, P., *Design of dosage forms, i Aulton's Pharmaceutics The Design and Manufacture of Medicines*, Aulton, M. E. (ed.). USA, Churchill Livingstone Elsevier, (2007). (3. utg): s. 4-14.
103. Higuchi, T. , *Mechanism of Sustained- Action Medication Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices*. Journal of Pharmaceutical Sciences, (1963). **52**: s. 1145-1149.
104. Chan, C., Han, D., et al., *An overview of liposome lyophilization and its future potensial*. . Journal of Controlled Release, (2009). **142**: s. 299-311.
105. Hurler, J., Zakelj, S., et al., *The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel*. International journal of Pharmaceutics, (2013). **456**: s. 49-57.
106. Lasic, D. D., *Liposomes: From Physics to Applications*. . Amesterdam, Elsevier Science B. V. , (1993). (1. utg.): s. 219-242.
107. Leung, D. og Lasic, D. D, *Stability and Stabilization of Liposomes, i Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes, From Design to Microreactors*, Barenholz, Y. og Lasic, D. D (ed.). New York, CRC Press LLC, (1996). (1. utg.): s. 31-43.
108. Crommelin, D. J. A., *Influence of Lipid Composition and Ionic Strenght on the Physial Stability of Liposomes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, (1983). **73**: s. 1559-1563.
109. Avanti^(R) Polar Lipids, Inc., *Natural Lipids*.
http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=351&Itemid=212&catnumber=441601, Hentet 08.08.2014.
110. Rabilloud, T. og Chevallet, M, *Solubilization of Proteins in Two-Dimensinal Electrophoresis, i Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*. Heidelberg, Springer- Verlag, (2000). (1. utg.): s. 9-13.

10. Vedlegg

Vedlegg 1: SOP-Opprensing av pektin

OPPRENSING AV PEKTIN

Oppløsning:

Pektin løses i vann på magnetrører (Tips: ha først vann i begerglasset, dryss deretter pektinet forsiktig over). Passende konsentrasjon er 1,5 %. Tid: Over natt

Sentrifugering:

Pektinløsningen overføres til store sentrifugerør av plast (med skrulokk). Pass på at rørene har samme fyllingsgrad for riktig balansering i sentrifugen.

Sentrifuger i 1 time (4400 rpm med rotor 224), dekanter løsningen og sentrifuger supernatanten ytterligere 1 time.

Dialyse:

Dialyseslange: Spectra/Por® 6, MWCO 8.000 Daltons (flat width 50 mm)

Forbehandling av dialyseslange:

Dialyseslangen må vaskes for å fjerne natriumazid. Bløtlegging i destillert vann i 15-30 minutter er tilstrekkelig.

Klipp av en passende lengde dialyseslange (se tabell), fest en klemme i den ene enden og fyll slangen med pektinløsning. Lukk også den andre enden med en klemme.

Volum prøveløsning (ml)	Lengde dialyseslange (cm)
100	19
150	27
200	34

Dialyseslangen plasseres i en 1000 ml målesylinder som fylles opp med destillert vann.

Målesylinderen settes i kjøleskap.

Vannet skiftes 7 ganger – med minst 24 timer mellom hver gang.

Frysetørring:

Ca 200 ml pektinløsning fylles i 1000 ml frysetørringskolbe, evt. 1000 ml rundkolbe.

Løsningen fryses inn under rotasjon på metanolbad (-40°C)

Vedlegg 2: SOP-Liposomer**PRODUKSJONSSKJEMA; LIPOSOMER**

PREPARAT:	MENGDE:	KONSENTRASJON:	PROD.NR.:
PROD. PÅBEGYNT:		UTSKREVET AV:	DATO:
PROD. AVSLUTTET:		PROD. UTFØRT AV:	

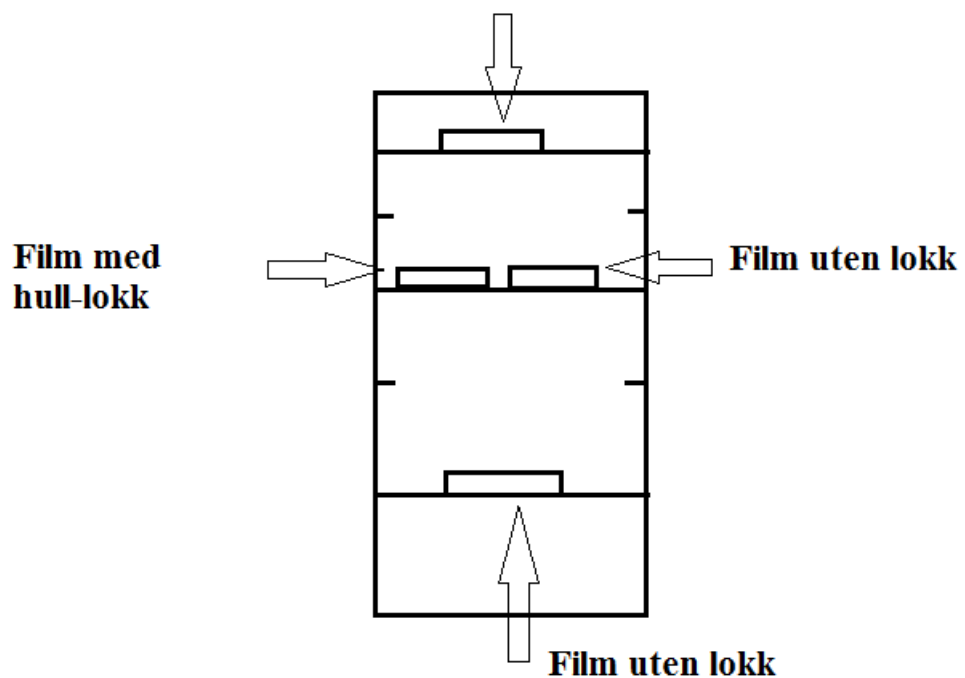
INNHALDSSTOFFE R	K.NR./ LEVERAN DØR	MENGDE	SIGN.	ANMERKNINGER

INNDAMPING:		SIGN.	FILMOPPLØSNING:		SIGN.
Dato:			Dato:		
Kolbestørrelse:	250 ml		Hydreringsmedium:		
Omdr.hastighet:	90 rpm		Omdr.hastighet:	90 rpm	
Temperatur:	40°C		Temperatur:		
Trykk:	60-65 mbar		Tid:	10 min	
Tid:	20 min		Kolbe fylt med N ₂ :		

EKSTRUDERING:		SIGN.			SIGN.
Dato:			Porestørrelse:		
Trykk:	<10 bar		Antall ekstruderings:		
Temperatur:					

Vedlegg 3: Tørkeprosessen i granulatskapet med ulik plassering

Rett under viften med hull-lokk



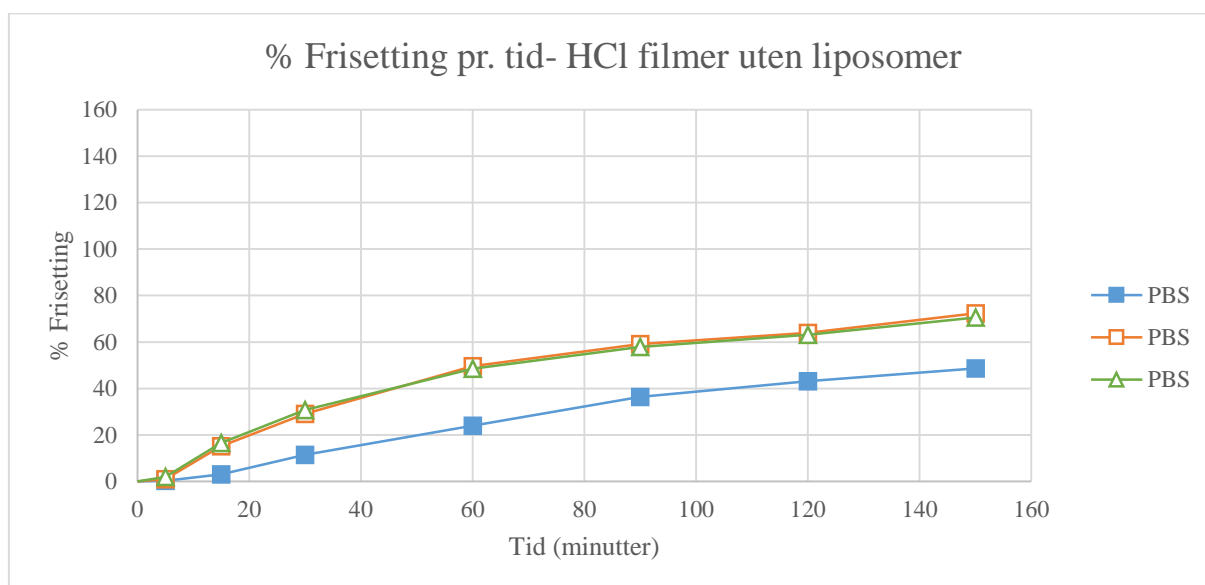
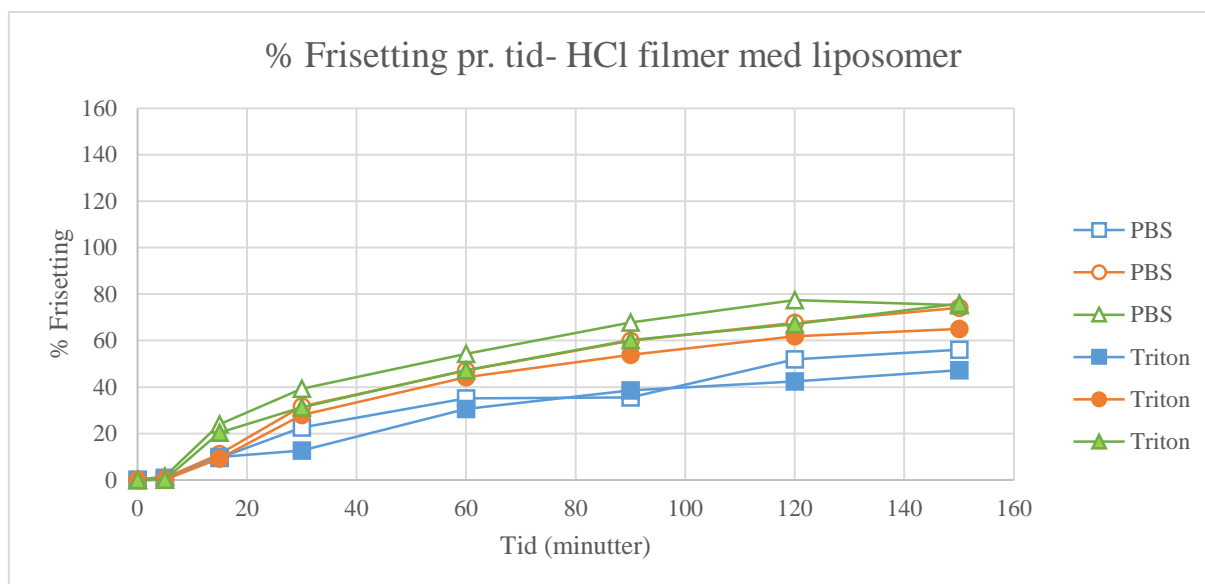
Vedlegg 4: PBS kapaisteten

Tid	pH i PBS uten liposomer	pH i PBS med liposomer
5 min	7,01	6,98
15 min	6,93	6,91
30 min	6,87	6,86
1 time	6,91	6,87
1 time 15 min	6,88	6,97
17 timer	6,76	6,79
21 timer	6,74	6,73

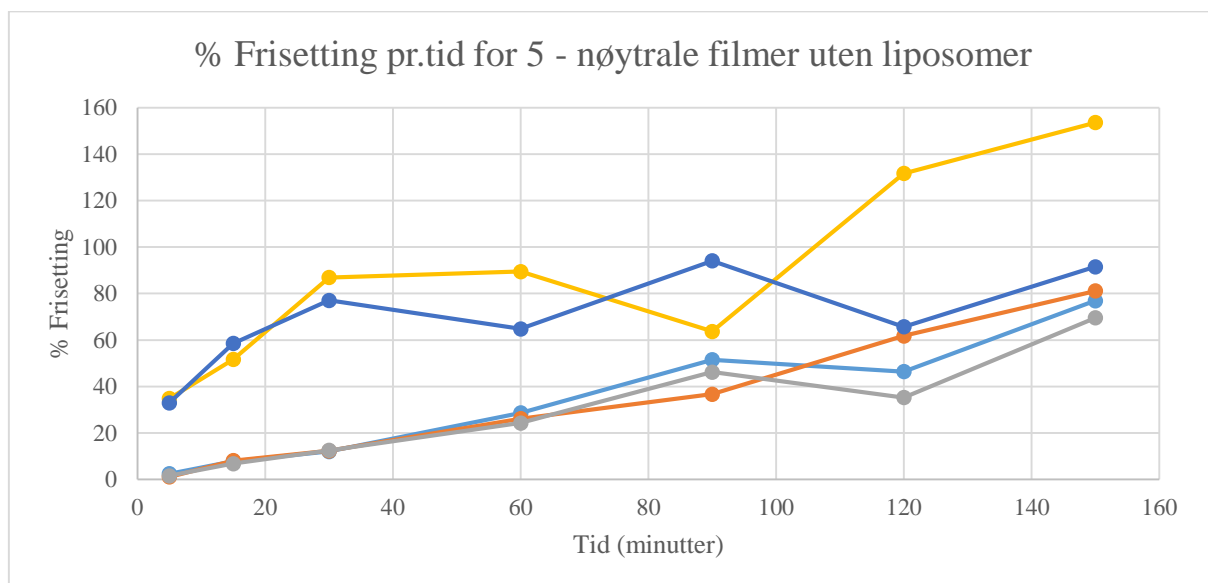
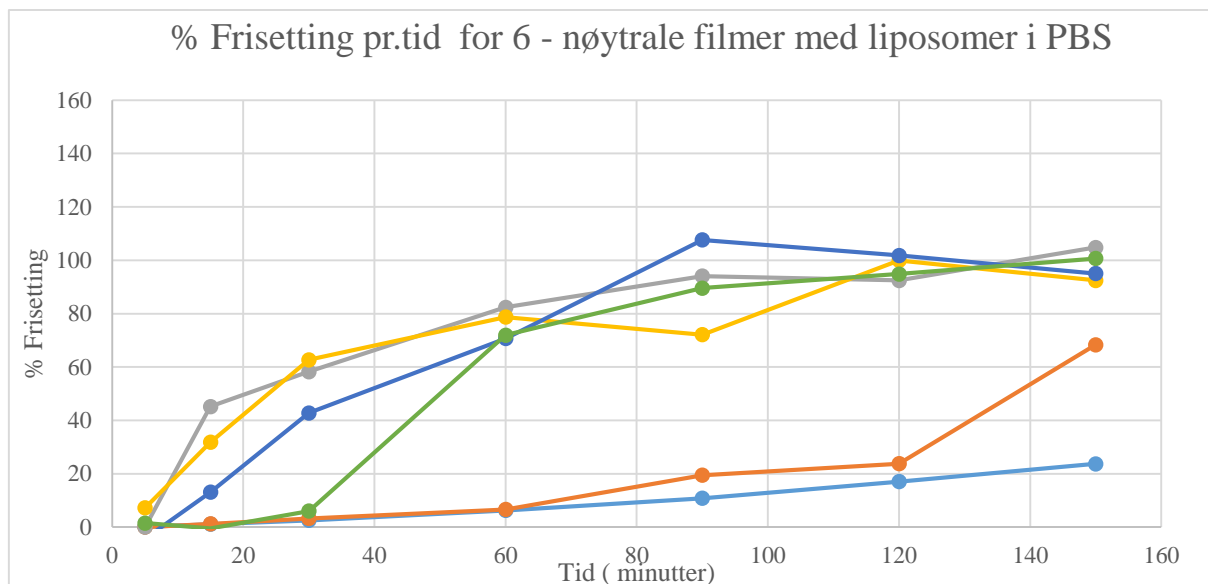
Vedlegg 5: Reproduserbarheten til standardkurven

Conc (uM)	Intensiteten ved ulike ganger forsøkene ble kjørt															
24	3713903	3686989	3694873	3693393												
12	3194766	3169003	3175029	3180433						3166104	3149201	3141843				
6	2765873	2857206	2751379	2883377	2763992	2778655	2791039	2793446	2815144	2811158	2797465	2786195	2515238	2851378	2848587	2842206
3	1953393	1933599	1940156	1945100	1881415	1896684	1900540	1902335	1919097	1873080	1865968	1861037	1937819	1926026	1923265	1914033
1,5	1199389	1187433	1188893	1195900	1135355	1145063	1146545	1147145	1156890	1142148	1139425	1134437	1147965	1147834	1147724	1144105
0,75	674073	666103	665078	671727	641859	646751	647083	646627	650871	641818	639958	637013	637433	640309	640220	637240
0,375	357269	353462	352063	359953	342520	344583	343751	344229	346196	361191	361199	359259	362022	363019	362062	362020
0,1875	185785	182970	182273	189481	178392	179827	179623	179024	180462	198758	197945	196419	200035	200637	200018	200111
0,09375					91609	91998	91978	92019	92910	108674	109033	108206	108279	109232	109051	109111
0,046875										60141	60861	60055	57468	57240	57832	57467

Vedlegg 6: Enkelt målinger – HCl filmer



Vedlegg 7: Enkelt målinger nøytrale filmer



Vedlegg 8: Enkelt målinger liposomer i PBS

